

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO PARASITOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Diseño, optimización y validación de sistemas de amplificación  
genómica para el diagnóstico de malaria y filariosis humanas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Thuy-Huong Ta Tang**

DIRECTOR

**José Miguel Rubio Muñoz**

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN  
DE SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN  
GENÓMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
MALARIA Y FILARIOSIS HUMANAS**

**TESIS DOCTORAL**

**THUY-HUONG TA TANG**

**MADRID 2015**

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE FARMACIA**

## **DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"



"

"

## **DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA Y FILARIOSIS HUMANAS**

"

Memoria presentada por **Thuy Huong Ta Tang** para optar al grado  
de **Doctor en Microbiología y Parasitología**

Dirigida por el Doctor:

**Jose Miguel Rubio Muñoz**

**D. Jose Miguel Rubio Muñoz**, Doctor en Ciencias Biológicas y Responsable del Laboratorio de malaria y otras Parasitosis Emergentes del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología perteneciente al Instituto de Salud Carlos III.

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de investigación titulado: "DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA Y FILARIOSIS HUMANAS", presentado por la Licenciada en Farmacia, **Thuy Huong Ta Tang**, ha sido realizado bajo su dirección en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, cumpliendo las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, Noviembre del 2015

VºBº

Dr. Jose Miguel Rubio Muñoz

A mi eterno y fiel compañero en esta vida Michel,  
a mis adorables hijos Fran e Isabella,  
a mi queridísima madre y a mis inseparables hermanos,  
los mejores tesoros de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

El primer agradecimiento es sin lugar a duda para mi director de Tesis, Jose Miguel Rubio, que me recibió y me acogió con los brazos abiertos en el peor momento de mi vida en aquél año 2006. Nunca olvidaré esta segunda oportunidad que me dio para seguir trabajando en Investigación, algo que adoro realmente, y después aceptar ser mi director de Tesis. Con él no sólo he aprendido a manejar, lidiar y perfeccionarme en las técnicas moleculares para el diagnóstico de infecciones parasitarias, sino también a ser ante todo una persona políticamente correcta cuando hay que serlo, a ser paciente con el trabajo, a aceptar los malos resultados que a veces llegan más veces que los buenos, a no pensar que eres más que los demás... Todo ha sido más fácil gracias a las charlas en privado contigo. Gracias por preocuparte por mi trabajo y por mi familia. Nunca será suficiente todo lo que te pueda decir en estas líneas porque hoy en día si soy lo que soy es gracias a ti.

Al amor de mi vida Michel, fiel e incansable compañero. Gracias a él también ha sido posible la realización de esta Tesis, por ser ese oído cuando lo necesitaba, ese pañuelo cuando lloraba, por ocuparte de la casa, la compra y los niños siempre que te lo pedido. Espero que a pesar de todas las desavenencias, sigamos juntos hasta el final.

A mi gran compañera Marta Lanza, una persona maravillosa y especial para mí. Gracias a ti siempre he tenido todo el material necesario y disponible para realizar mi trabajo, parte de esta Tesis también lo has realizado tú. Contigo todo el sistema administrativo del laboratorio ha sido más fácil. Hemos tenido muchas charlas juntas de todo tipo y espero seguir teniéndolas por mucho tiempo. Gracias por tu apoyo.

A María Flores por supuesto, gracias a ti siempre tengo una segunda visión de las cosas. Aunque tengamos visiones diferentes me has ayudado y aportado un montón. La comida de la 13:30 en la cafetería era mi momento favorito del día, ¡cuántas opiniones intercambiábamos! Espero recuperar otra vez esos momentos... aunque a veces me lleve alguna pequeña riña por tu parte.

A todo el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, en especial a Teresa Gárate, cuando entré eras la jefa del Servicio de Parasitología y me recibiste con las puertas abiertas. Con algunos compañeros he tenido más contacto, con otros menos pero todos me habéis aportado para formarme como investigadora y como persona. Habéis sido siempre muy comprensivos conmigo en mis momentos de desesperación.

No quiero olvidarme de aquellos compañer@s que tuve al inicio de esta Tesis y que ahora están en otros Centros: Marwa, Susana Arahuete, Eva Moyano, Edurne, Susana Plazuelo, Yago Cervera-Alonso, Alejandra Blanco,...y muchos más que no me acuerdo de sus nombres pero sí de sus personas.

A Rogelio por su siempre incondicional ayuda, arriesgó mucho por mí, sólo espero no haberle defraudado. Con él aprendí la clínica de la malaria y la oncocercosis y me hizo querer más de lo que ya quería a los parásitos. Espero que sigamos trabajando juntos.

A Rafael Cantón, Francisco Javier González (Tutor de Investigación y Tutor de Residentes respectivamente del Hospital Ramón y Cajal en mis años de residencia), y a Marisa Mateos también del mismo hospital, sin ellos nunca hubiera conocido el Instituto de Salud Carlos III, y todo lo que me vino después.

A Paco Merino, ese conversador incansable sobre Parasitología por teléfono y que me hace perder la noción del tiempo cuando hablamos. Que ve microfilarias por microscopía y alguna vez puso en duda nuestra PCR diseñada para filarias.

A Alicia Gómez Barrio, mi Tutora de Tesis en la Facultad de Farmacia, aunque nos conocimos muy al final de la Tesis tu ayuda ha sido muy valiosa y sin ti los trámites de esta Tesis no habrían ido tan rápido como han ido. Gracias a ti todo ha entrado en el plazo establecido.

A todas aquellas personas que han formado parte de mi vida y que de alguna manera me han ayudado a acabar esta Tesis, que llegué a pensar en algún momento que ya nunca lo acabaría.

A mi mamá, gracias por quedarte con Fran e Isabella cuando te he llamado. A mis hermanos, que siempre sigamos en contacto.

Me dejo para el final a mis niños pequeños, Fran e Isabella, pero no por eso menos significantes en mi vida. Sois el motor de mi vida, sin vosotros todo lo que hace mamá no tiene sentido. Perdón por no llevaros al parque durante un tiempo y gracias por dejar a mamá terminar esta Tesis. Recuperaremos el tiempo.

A todos vosotros os dedico este trabajo, espero que os resulte ameno. Esta tesis tan larga, ha llegado a su fin...

*“En este siglo acabaremos con las enfermedades, pero nos matarán las prisas”*

*Gregorio Marañón*

## ÍNDICE



Índice.....	i
Resumen/Summary.....	iv
Abreviaturas.....	vii
Listado de figuras.....	ix
Listado de tablas.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Enfermedades causadas por parásitos.....	1
2. Clasificación de los parásitos.....	3
3. Parásitos hemáticos.....	5
3.1 Género <i>Plasmodium</i> spp.....	6
3.1.1 Epidemiología.....	7
3.1.2 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.....	8
3.1.3 Patología.....	10
3.1.4 Tratamiento.....	12
3.1.5 Evolución filogenética y genoma de <i>Plasmodium</i> spp.....	15
3.2 Filarias.....	17
3.2.1 Epidemiología.....	18
3.2.2 Ciclo biológico.....	19
3.2.3 Patología.....	20
3.2.4 Tratamiento.....	21
3.2.5 Evolución filogenética y genoma de <i>B. malayi</i> .....	22
4. Diagnóstico de las infecciones parasitarias.....	23
4.1 Diagnóstico clínico.....	24
4.2 Diagnóstico de laboratorio.....	25
4.2.1 Métodos indirectos serológicos.....	25
4.2.2 Métodos directos.....	26
4.2.2.1 Microscopia.....	26
4.2.2.2 Detección de antígenos (Prueba de diagnóstico rápido).....	33
4.2.2.3 Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos.....	35
5. Aplicaciones y utilidad de los Sistemas de Análisis Múltiple (SAM).....	42

II. OBJETIVOS.....	45
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
1. Material	
1.1 Muestras clínicas.....	46
2. Métodos	
2.1 Diagnóstico microscópico.....	47
2.1.1 Malaria.....	47
a) Gota gruesa (GG).....	47
b) Extensión fina (Frotis).....	47
2.1.2 Filarias.....	48
a) Técnica de concentración de Knott.....	48
b) Microfilarias en piel ("pellizcos cutáneos", "skin snips").....	49
2.2 Métodos de diagnóstico molecular.....	49
2.2.1 Métodos de extracción de ácidos nucleicos (ADN).....	49
2.2.1.1 Método de Chelex.....	49
2.2.1.2 Método de purificación por columnas.....	50
2.2.2 Nested-Multiplex Malaria PCR.....	51
2.2.3 Real Time Malaria PCR (RT- Malaria -PCR).....	53
2.2.4 Nested-Filaria PCR.....	54
2.2.5 Real Time Filaria PCR.....	55
2.2.6 Visualización de los fragmentos de ADN amplificados.....	56
2.3 Purificación y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados.....	57
2.4 Determinación de la Especificidad y Sensibilidad de los métodos.....	58
IV. RESULTADOS.....	
IV.1. "PCR en tiempo real para la detección de las cinco especies de malaria humana".	
No sometido.....	61
IV.2. "First case of detection of <i>Plasmodium knowlesi</i> in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia".....	82
IV.3. "First case of a naturally acquired human infection with <i>Plasmodium cynomolgi</i> "...90	
IV.4. "Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species <i>Onchocerca volvulus</i> , <i>Mansonella ozzardi</i> and <i>M. perstans</i> in the Amazon region".....	100
IV.5. "Atypical <i>M. ozzardi microfilariae</i> from an endemic area of Brazilian Amazonia and the questionable existence of <i>M. perstans</i> in South America" En proceso de revisión para su publicación.....	108

IV.6. "Geographical distribution and species identification of Human Filariasis and Onchocerciasis in Bioko Island, Equatorial Guinea". No sometido.....	123
V. DISCUSIÓN.....	143
1. Enfermedades de la pobreza y enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs)..	143
2. Métodos de diagnóstico para las infecciones parasitarias.....	146
2.1 Métodos convencionales: microscopía, Pruebas de Diagnóstico Rápido (RDTs), serología.....	146
2.2 Métodos moleculares aplicados a malaria.....	152
2.3 Métodos moleculares aplicados a filariasis humana.....	156
3. Sistemas de Análisis Múltiple para el diagnóstico clínico.....	164
VI. CONCLUSIONES.....	168
BIBLIOGRAFÍA.....	169

**RESUMEN/SUMMARY**

"  
"

## RESUMEN

Las enfermedades parasitarias o parasitosis son un conjunto de enfermedades infecciosas producidas por protozoos, helmintos, e incluso artrópodos. La enfermedad parasitaria más importante es la malaria que está incluida en la lista de enfermedades de la pobreza. Otras enfermedades parasitarias han sido incluidas en las denominadas enfermedades olvidadas o desatendidas (NTD: Neglected Tropical Diseases) entre las que se encuentran las filariosis linfática y onchocercosis.

La malaria está causada por el género *Plasmodium* (protozoos apicomplejo). Las especies que pueden causar la infección en humanos son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*.

Las filarias son nematodos finos y largos, parásitos de la sangre, la linfa y los tejidos subcutáneos y conectivos que producen en el humano la filariosis. Su transmisión se produce por insectos hematófagos (mosquitos y moscas) que actúan como vectores. Las especies de filarias de interés clínico para los humanos son *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *B. timori* (filariosis linfática), *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* y *Mansonella streptocerca* (filarias dérmicas), y *Mansonella perstans* y *M. ozzardi* (mansonelosis). Todas ellas presentan estadios larvales, conocidos como microfilarias (L1), que circulan en sangre o en tejido subcutáneo que son las formas infectivas para los vectores.

En el Laboratorio de Malaria & otras Parasitosis Emergentes se ha desarrollado una PCR en tiempo real para malaria (Malaria RT-PCR), una Nested-PCR para filarias (Nested-Filaria PCR) y una PCR en tiempo real para filarias (RT-Filaria-PCR) como Sistemas de Análisis Múltiple para la detección de varias especies de plasmodios y varias especies de filarias en muestras de cualquier índole como indicador que los Sistemas de Análisis Múltiple son comparativamente superiores a los métodos de detección individual y a la microscopía sin perder sensibilidad y especificidad.

Todos los métodos desarrollados han dado muy buenos resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad frente a los métodos tradicionales, de tal manera que hoy en día se usan en el Laboratorio de Malaria & otras Parasitosis Emergentes como métodos de referencia, planteando la posibilidad de usar el método de las filarias para un estudio actualizado de la distribución y prevalencia de las filarias en las zonas endémicas.

"  
"

## SUMMARY

Parasitic diseases are a group of infectious diseases caused by protozoa, helminths, and even arthropods. The most important parasitic disease is malaria which is included in the list of diseases of poverty. Other parasitic diseases have been included in Neglected Tropical Diseases (NTD) among them are the lymphatic filariasis and onchocercosis.

Malaria is caused by *Plasmodium* (protozoa apicomplexo) The species that can cause infection in humans are: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*.

Filarial worms are thin and long nematodes, parasites of blood, lymph and subcutaneous and connective tissues that cause in humans filariasis disease. Its transmission is by blood-sucking insects (mosquitoes and flies) that act as vectors. Filarial species of clinical interest for humans are *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *B. timori* (lymphatic filariasis), *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* and *Mansonella streptocerca* (filarial skin), and *Mansonella perstans* and *M. ozzardi* (mansonelliasis). All of them present larvae, known as microfilariae (L1), which circulate in blood or in subcutaneous tissue forms that are infective for vectors.

In the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory has developed a Real-time PCR for malaria (RT-Malaria-PCR), a Nested-PCR for filarias (Nested-Filaria PCR) and Real-time PCR for filarias (RT-Filaria-PCR) for the detection of several species of plasmodia and various filarial species in samples of any origin, like an indicator that Systems of Multiple Analysis are comparatively higher than individual detection methods and microscopy without losing sensitivity and specificity.

All methods developed have been very successful in terms of sensitivity and specificity compared to traditional methods, today they are used in the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory as reference methods, and suggesting the possibility of using the filarial method to update the knowledge about distribution and prevalence of filarial in endemic areas.

**“Design, optimization and validation of genomic amplification systems for human malaria and filariasis diagnosis”**

## INTRODUCTION

WHO classified AIDS, tuberculosis and malaria as diseases of poverty and other seventeen diseases as Neglected Tropical Diseases (NTD). The list of NTD has been increasing over the years including dengue, rabies, blinding trachoma, Buruli ulcer, endemic treponematoses (yaws), leprosy (Hansen's disease), Chagas disease, human African trypanosomiasis (sleeping sickness), leishmaniasis, cysticercosis, dracunculiasis (Guinea worm disease), echinococcosis, trematode infections transmitted by food (clonorchiasis, opisthorchiasis and fascioliasis), lymphatic filariasis, onchocerciasis (river blindness), schistosomiasis (bilharziasis) and soil-transmitted Helminthiasis.

This Thesis has focused in several of these poverty and neglected diseases: malaria and filariasis such as lymphatic filariasis and onchocerciasis (river blindness). All of these diseases are currently under control programs supported by international organizations.

The main goal of any control program of disease is to ensure that infection elimination is real. Therefore, it is necessary to have good diagnostic tools which should be highly sensitive and specific in an environment of low prevalence and low parasite load due to mass drug administration (Mas *et al.*, 2006), semi-immunity in the case of malaria (Rubio *et al.*, 1999) and zoonoses infection (Ta *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2014) or atypical location of microfilariae: *O. volvulus* in blood (Duke *et al.*, 1975; Fuglsang and Anderson, 1974), *Loa loa* in skin (The Haouri *et al.*, 2001), *M. ozzardi* and *M. perstans* in skin (Ewert *et al.* 1981; Moraes *et al.*, 1983, Ta Tang *et al.*, 2015).

An accurate diagnosis is essential for the proper treatment, both individually (malaria) and in control programs (onchocerciasis), avoiding unnecessary treatments and the development of resistance in the absence of emergence of new drugs (WHO, 2014). The diagnostic as an epidemiological tool, helps to understand the impact of different control measures, like mass drug treatment or vectorial control, have on the transmission and prevalence of a given disease.

It is also important to investigate new diagnostic methods for the differential diagnosis, for example in the case of filarial, where mass drug administration is implemented with ivermectin against *O. volvulus* should not be used in areas of high prevalence of *L. loa* and *W. bancrofti* due to the serious effects produced in infected individuals (Molyneux *et al.*, 2014).

Malaria is caused by *Plasmodium* (protozoa apicomplexo) The species that can cause infection in humans are: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*.

Filarial species (thin and long nematodes) that cause in humans filariasis disease are *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *B. timori* (lymphatic filariasis), *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* and *Mansonella streptocerca* (subcutaneous tissue), and *Mansonella perstans* and *M. ozzardi* (mansonelliasis).

### **General objective:**

Design, optimize and/or validate multiple genomic amplification systems based on conventional PCR and quantitative PCR, integrating in simple processes the detection and characterization of five species of *Plasmodium* that cause malaria in humans (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi*) and human filariasis (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. timori*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *M. ozzardi* and *M. streptocerca*) and to select from those designed systems the best in sensitivity and specificity for each disease with improved time and resources (human and material) versus diagnostic methods used currently.

### **Specific objectives**

To achieve the overall objective, the following specific objectives were proposed:

1. Design, optimization and field validation of diagnostic method based on genomic amplification by real-time PCR for the identification and characterization of the different *Plasmodium* that affect humans.
2. Design, optimization and validation in field of diagnostic method based on genomic amplification by nested PCR for the identification and characterization of different human filariasis
3. Design, optimization and field validation of diagnostic method based on genomic amplification by real-time PCR for the identification and characterization of different human filariasis.



## RESULTS

The Gold Standard method for diagnosing malaria is microscopic examination of thin and thick blood smear stained with Giemsa. However, microscopy has its limitations in this regard: it is time consuming, misidentification species are common, particularly if the microscopist is inexperienced or when the parasitaemia is low (microscopic sensitivity: 20-50 parasites/ul blood or 0.0004 to 0.001%), like in asymptomatic carriers. Nevertheless, the microscopy technique is still considered the reference method for the diagnosis of malaria.

In our results the use of microscopy and RDT (Rapid Diagnostics Tests) has not been helpful. In the case of *P. knowlesi* infection in a traveler from Southeast Asia (Ta *et al.*, 2010) both rapid test as microscopy initially they were negative. Neither microscopy could characterize the first report of *P. cynomolgi* naturally acquired by a human (Ta *et al.*, 2014). In the second case, the parasites was diagnosed as *P. vivax* infection, only genomic amplification and confirmed by sequencing gave the correct diagnosis of infection by *P. cynomolgi*. In first natural infection with *P. cynomolgi* could not perform RDT in Kuala Lumpur.

Regard to filariasis, in our study of filariasis in Brazilian Amazon (Ta Tang *et al.*, 2015a. Submitted) more than 20% of microfilariae present in the Pauini inhabitants showed an atypical morphology, which several microscopists characterized as *M. perstans*. Using conventional parasitological techniques differentiation between the microfilariae species is quite difficult, since there are no reliable morphological criteria to tell them apart. Molecular biology techniques confirmed that atypical filaria described in our work corresponded to *M. ozzardi* with a morphology modified with respect to the design type, matching the result in similar atypical filaria described in Peru by other authors (Mark *et al.*, 2012). Our results show that the specificity of microscopy depends on the microscopist subjectivity and his experience.

In this Thesis various systems of multiplex amplification based on nested PCR or real-time PCR were designed, optimized, validated and applied both in the laboratory and in field to identify the different species of *Plasmodium* that can infect humans, including not typical species (Ta Tang, RT-PCR Malaria, unpublished), and to identify filarial both in skin and blood (Tang *et al.*, 2010)

Multiple Analysis Systems designed here have enabled to perform different studies with very different objectives using the same techniques saving on materials, equipment and personnel, but also allowed us to achieve results that other individual methods have been difficult to obtain such as:

- Detection of malaria infections in humans by plasmodia usually infects monkeys (Ta *et al*, 2010, 2014.).
- Characterization of *Mansonella ozzardi* from a filarial series with atypical morphology (Ta Tang *et al*, 2015. Submitted.).
- Detection of *M. streptocerca*, *M. perstans* and *Loa loa* in skin when only *O. volvulus* was expected (Ta Tang *et al*, 2015b. Unsubmitted).

Furthermore, these methods (Real Time-Malaria-PCR, Filaria Nested PCR and RT-Filaria-PCR) have been incorporated into the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory as reference methods

## **CONCLUSIONS**

- 1.** Multiple Diagnostic Methods, for example, those designed and used in this thesis have shown to satisfy the criteria required for any new diagnostic method; sensitivity, specificity, and reduced turnaround time but the most important is simplifying the diagnosis, reduce the number of reactions and in parallel the cost, and to bring closer to endemic areas where laboratories have low resources.
- 2.** The genomic amplification by real time PCR for malaria (RT-Malaria-PCR) designed has shown enough sensitivity and specificity for using in human malarial diagnosis. Its sensitivity is 0.1 parasites/ul (0.000002%), 1000 times higher than microscopy but slightly lower sensitivity against reference technique (Nested Multiplex Malaria PCR: 0.01 parasites/ul).
- 3.** RT-Malaria-PCR allows detecting malaria infections in humans by plasmodia that normally infect monkeys due to the gender-specific and gender-specific primers, great advantage regard the standard technique.
- 4.** The genomic amplification by nested PCR (FnPCR) designed for the identification and characterization of different human filariasis demonstrates the requirements of sensitivity and specificity, versatility to be applicable to samples of any origin, low invasiveness by requiring minimal sample and economical because it detects any species of filaria simultaneously.
- 5.** The genomic amplification by real time PCR for identification and characterization of different human filariasis (RT-filaria-PCR) has higher sensitivity and specificity than microscopy. Although the sensitivity is slightly lower than the FnPCR, RT-filaria PCR is quicker and less laborious.
- 6.** Both FnPCR as RT-filaria-PCR allow for better and more accurate characterization of filariasis; where for microscopy is inaccurate in cases of atypical morphology or locations, detection with conventional PCR and real time PCR demonstrated accuracy.

## **ABREVIATURAS**

**ACT:** Artemisin Combined Treatment (tratamiento combinado con artemisina)  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNr:** ácido desoxirribonucleico ribosomal  
**APOC:** African Programme for Onchocerciasis Control, 1995  
**AM:** Amazonas  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**BLAST:** Basic local alignment search tool (herramienta de búsqueda para alineamientos locales básicos)  
**°C:** grado centígrado  
**CSP:** proteína del circunsporozoíto  
**DEC:** dietilcarbamacina  
**Dr:** doctor  
**EDTA:** etilendiaminotetraacético  
**EEUU:** Estados Unidos  
**ELISA:** enzyme linked immunosorbent assay (enzoinmunoensayo)  
**EMBL:** European molecular Biology Laboratory  
**EXPAR:** exponential amplification reaction (reacción de amplificación exponencial)  
**FASTA:** buscador de secuencias similares  
**FnPCR:** Filaria Nested PCR  
**FVP:** fracción de verdaderos positivos  
**FVN:** fracción de verdaderos negativos  
**GG:** gota gruesa  
**GPELF:** Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis, 2000-  
**h:** hora  
**HDA:** helicase-dependent amplification (amplificación helicasa dependiente)  
**HEMOAM:** Hematología e Hemoterapia do Amazonas  
**HIV:** virus de la inmunodeficiencia humana  
**HRM:** high resolution melting (curva de desnaturalización de alta resolución)  
**HRP-2 :** histidin rich protein 2 (proteína rica en histidina-II)  
**IFI:** inmunofluorescencia indirecta  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**IMR:** Institute Medical Research (Instituto de Investigación Médica)  
**INAD:** isothermal nucleic acid detection assay (ensayo de detección de ácido nucleico isotérmico)  
**ISCI:** Instituto de Salud Carlos III  
**ITS-1:** internal transcriber spacer 1 (espaciador interno transcribible 1)  
**kDa:** kilodalton  
**kb:** kilobase  
**LAMP:** loop-mediated isothermal amplification (amplificación isotérmica mediada por *loop*)  
**L1:** larva estadio 1  
**L3:** larva estadio 3  
**MAPELab:** Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes  
**Mb:** megabases  
**mg:** miligramo  
**min:** minutos  
**Mg:** magnesio  
**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio  
**ml:** mililitro  
**mM:** milimolar  
**MRC:** Medical Research Center,  
**MSP:** Major Sperm Protein (Proteína Mayor del Esperma)  
**NASDA:** nucleic acid sequence-based amplification (amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico)  
**ND:** no data (sin datos)

**NEAR:** nicking enzyme amplification (amplificación enzimática por mellado)  
**nm:** nanometro  
**NTD:** Neglected Tropical Diseases  
**OCP:** Onchocerciasis Control Programme in West Africa, 1975-2002  
**OEPA:** Onchocerciasis Elimination Program for the Americas, 1993  
**OMS:** organización mundial de la salud  
**ONU:** Organización de Naciones Unidas  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)  
**pLDH:** *Plasmodium* lactato deshidrogenasa  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**RAPD:** Random amplified polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar)  
**RDT:** rapid diagnostic test (prueba de diagnóstico rápido)  
**RCA:** rolling circle amplification (amplificación en círculo rodante)  
**RPA:** recombinase polymerase amplification (amplificación de la polimerasa recombinasa)  
**r.p.m:** revoluciones por minuto  
**RT-PCR:** real time PCR (PCR en tiempo real)  
**SAM:** Sistema de Análisis Múltiple  
**SDA:** strand-displacement amplification (amplificación por desplazamiento de cadena),  
**SEMTSI:** Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional  
**SIDA:** síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.  
**sp.:** especie  
**ssu rARN:** small subunit ribosomal (subunidad pequeña) del ARN  
**TAE:** tampón tris-acetato-EDTA  
**THA:** tripanosomiasis humana africana  
**Tm:** temperatura de melting  
**Tris-HCL:** trihidroxi metil aminometano clorhídrico  
**µm:** micra  
**µl:** microlitro  
**µM:** micromolar  
**VPP:** valor predictivo positivo  
**VPN:** valor predictivo negativo  
**WHO:** World Health Organisation

**LISTADO DE FIGURAS**

"  
"

## I. Introducción

Figura 1: Clasificación esquemática de parásitos humanos (protozoos y helmintos)

Figura 2: Ciclo biológico de *Plasmodium spp.*

Figura 3: Evolución histórica de la resistencia de *P. falciparum* a cloroquina.

Figura 4: Algoritmo de diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España.

Figura 5: Árbol filogenético de las especies de *Plasmodium*.

Figura 6: Ciclo biológico de *O. volvulus*

Figura 7: Diferenciación de las microfilarias

Figura 8: Microfilarias de *M. streptocerca* en un pellizco cutáneo de una paciente de Guinea Ecuatorial.

Figura 9: Semi-Nested Multiplex Malaria PCR

Figura 10. Malaria Real Time PCR. Curva de desnaturalización

Figura 11. LAMP visualización con SYBR green bajo luz ultravioleta

## III. Material y Métodos

Figura 1. Resultados de la primera y segunda PCR de la Nested Malaria PCR. Imagen tomada de Ta-Tang *et al.*, (2011)

Figura 2. Esquema del diseño de la RT- Malaria-PCR."

Figura 3. Análisis de la curva de desnaturalización de los fragmentos obtenidos en la RT Filaria PCR. Tm entre 77-78°C indica infección por una filaria.

## V. Discusión

Figura 1. Extensiones de sangre teñidas con Giemsa del paciente infectado con *P. knowlesi*. a-b: trofozoitos maduros; c: gametocito; d: etapa indefinida; e-f: trofozoitos tempranos.

Figura 2. Árbol filogenético del género *Plasmodium* usando el método de Neighbour Joining.

Figura 3: Extensiones de sangre teñidas con Giemsa. Comparación morfológica de cabezas y colas de microfilarias correspondientes a *M. perstans* africana (A,B), atípica microfilaria en Amazonas (C,D) y *M. ozzardi* (E,F).

Figura 4. Productos de amplificación de la Nested PCR para filarias

Figura 5: Disposición del ADNr eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem; el ADNr 5S se codifica separadamente. NTS: espaciador no transcribible, ETS: espaciador transcribible externo, ITS: espaciador transcribible interno. Fuente:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot\\_rdna.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png)



"  
"

Figura 6. Alineamiento de la zona del cebador ITS-1F con las mutaciones en algunas secuencias de *Loa* y *Wuchereria*.

"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"

**LISTADO DE TABLAS**

"  
"

## **Introducción**

Tabla 1. Lista de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs)

Tabla 2. Comparación de las principales características morfológicas para la diferenciación de especies de *Plasmodium*.

Tabla 3. Se comparan las distintas especies de filarias mostrando sus principales características para ayudar en la identificación de la especie infectante.

Tabla 4. Actuales métodos para el diagnóstico de malaria y filaria con sus principales ventajas y desventajas.

## **Material y Métodos**

Tabla 1. Mezcla de reacción para la primera y segunda reacción de la Nested Malaria PCR.

Tabla 2. Secuencia, concentración final de uso, temperatura de alineamiento de los cebadores y tamaño del fragmento esperado para la primera y segunda reacción de la Nested Malaria PCR.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los cebadores y sondas de la RT-Malaria-PCR con sus características principales, especificidad, canal de lectura y concentración final.

Tabla 4. Secuencia nucleotídica, especificidad y localización de los cebadores de la Nested-Filaria PCR y tamaño de los fragmentos esperados"

Tabla 5. Tamaños de los fragmentos obtenidos después de la digestión de los productos de amplificación de la Nested-Filarias PCR con *Taq I*

# I. INTRODUCCIÓN

"

# I. INTRODUCCIÓN

"

## 1. Enfermedades causadas por parásitos

Las enfermedades parasitarias o parasitosis son un conjunto de enfermedades infecciosas que se podrían definir como aquellas causadas por organismos que no están incluidos dentro de los grupos taxonómicos de virus, bacterias u hongos. Aunque incluso esta definición tan abierta, que incluiría aquellas enfermedades infecciosas producidas por protozoos, helmintos, e incluso artrópodos, excluiría a una serie de patógenos de difícil adscripción taxonómica como los microsporidios que recientemente se han incluido en el reino de los fúngicos.

Los parásitos son un grupo de organismos muy complejo, incluidos dentro del dominio de los eucariotas que abarca desde microorganismos unicelulares, representados por el reino polifilético de los protistas, hasta multicelulares de alta complejidad como son los piojos pertenecientes al grupo de artrópodos parásitos. Su tamaño puede oscilar desde poco más de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro (tamaño de bacterias) a platelmintos que pueden llegar a los 10 metros de longitud.

Su ciclo de vida es igualmente complejo, de forma que algunos establecen una relación permanente con el ser humano, y otros atraviesan un conjunto de etapas de desarrollo en una serie de anfitriones animales pasando en ambos casos por diferentes estadios morfológicos.

Una de las mayores dificultades en el estudio de las parasitosis humanas es no sólo comprender el conjunto de enfermedades que causan, sino también conocer la epidemiología de estas infestaciones, la cual es fundamental para entender el modo de controlarlas y prevenirlas.

Las enfermedades parasitarias, con el éxito de erradicación de muchas de ellas como la malaria o paludismo, en los países del hemisferio norte se las considera exclusivamente enfermedades tropicales pero muchas de ellas siguen estando presentes en nuestro entorno como la criptosporidiasis. Además estos éxitos momentáneos llegaron a conjeturar la próxima erradicación de las más importantes disminuyendo la formación en las mismas y los fondos dedicados a su control, incluyéndose aquí investigación de la enfermedad, desarrollo de nuevos fármacos que junto a otros parámetros como guerras, movimientos poblacionales, cambio climático, resistencia a los tratamientos han provocado un resurgimiento de muchas de ellas especialmente en las zonas más pobres del planeta. La enfermedad parasitaria más importante por la mortalidad, morbilidad y días de trabajo perdidos es la malaria que

"

está incluida junto a la tuberculosis y el SIDA en la lista de enfermedades de la pobreza. Otras enfermedades parasitarias, generalmente las más prevalentes o aquellas que están cerca de su erradicación, han sido incluidas en la lista de las denominadas enfermedades olvidadas o desatendidas, NTD por sus siglas en inglés (Neglected Tropical Diseases). Las NTDs son un conjunto de 17 enfermedades infecciosas, endémicas en 149 países y que afectan a más de 1,4 billones de personas (OMS, 2013).

Tabla 1. Lista de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs)

<b>Grupo Taxonómico</b>	<b>NTD</b>
Virus	Dengue, rabia
Bacterias	Úlcera de Buruli, lepra, trachoma, pian
Protozoos	Enfermedad de Chagas, tripanosomiasis africana humana, leishmaniasis
Helminthos	Cisticercosis, dracunculosis, equinococosis, nematodiasis transmitidas por los alimentos, filariasis linfática, oncocercosis, esquistosomiasis y helmintiasis transmitidas por el suelo

Aunque clínicamente son muy diversos desde la sintomatología hasta la taxonomía del agente causante, se agrupan por están fuertemente asociadas a la pobreza, afectan a zonas tropicales donde tienden a coexistir, y son enfermedades que se conocen desde la antigüedad pero para las que no se han buscado remedios eficaces. Son enfermedades silentes/ocultas concentradas en zonas rurales, en tugurios o zonas remotas cuyas personas no tienen voz política. No causan millones de muertos como el HIV/SIDA, tuberculosis o malaria, no afectan generalmente a viajeros con lo cual tampoco se diseminan a países lejanos, causan estigmas y discriminación en la sociedad (especialmente en niñas y mujeres), tienen gran impacto en la morbilidad, pero no así en la mortalidad.

Muchas de ellas han ido desapareciendo gradualmente conforme han ido mejorando las condiciones higiénicas, alimentarias y de viviendas del país. Son enfermedades que pueden ser controladas, prevenidas o evitadas, y posiblemente eliminadas usando soluciones factibles y efectivas, como un diagnóstico microbiológico precoz, el desarrollo de nuevos y eficaces tratamientos y la mejora de las condiciones higiénicas (Mackey *et al.*, 2014).

## 2. Clasificación de los parásitos

El nuevo consenso taxonómico está basado en los conocimientos sobre la bioquímica y biología molecular. Las comparaciones del ARN ribosómico de la subunidad pequeña (ssu rARN) y las secuencias de proteínas han permitido distribuir los organismos en grupos según las distancias evolutivas (Teixeira *et al.*, 2002; Ersfeld, 2003).

En la Figura 1 se muestra de una manera sencilla y breve la clasificación de aquellos parásitos humanos patogénicos y no patogénicos según Cavalier-Smith T (2004).

Los **protozoos** son microorganismos eucariotas sencillos cuyo tamaño oscila entre 2-500  $\mu\text{m}$ . Su protoplasma (citoplasma + núcleo/s) está envuelto por una membrana celular y alberga numerosos orgánulos. El núcleo contiene cromatina dispersa o formando cúmulos y un cariosoma central. Los órganos de movilidad van desde pseudópodos hasta estructuras más complejas, como los flagelos y los cilios.

Los **helminths** incluyen a los parásitos platelmintos (gusanos planos) y a los nematodos (gusanos redondos). Son organismos pluricelulares, de gran complejidad, con estructuras que le permiten adaptarse a la vida parasitaria como piezas bucales para desgarrar, ventosas y ganchos para sujetarse, etc...El tegumento también está adaptado a la vida parasitaria; es resistente a las enzimas y jugos gástricos del hospedador e incluso participa activamente en la absorción del alimento (los cestodos carecen de aparato digestivo). El aparato reproductor está muy desarrollado. Las formas infectantes (huevos y larvas) deben, salvo excepción, salir al exterior, lo que implica notables pérdidas que se subsanan con la gran cantidad de huevos que son capaces de producir.

Los parásitos pueden presentar ciclos vitales o biológicos complejos que afectan a un único hospedador (ciclo directo) o a múltiples anfitriones (ciclo indirecto). El conocimiento de los ciclos biológicos de los parásitos es la clave para entender la distribución geográfica, la transmisión y la patogenia de las enfermedades parasitarias que producen.

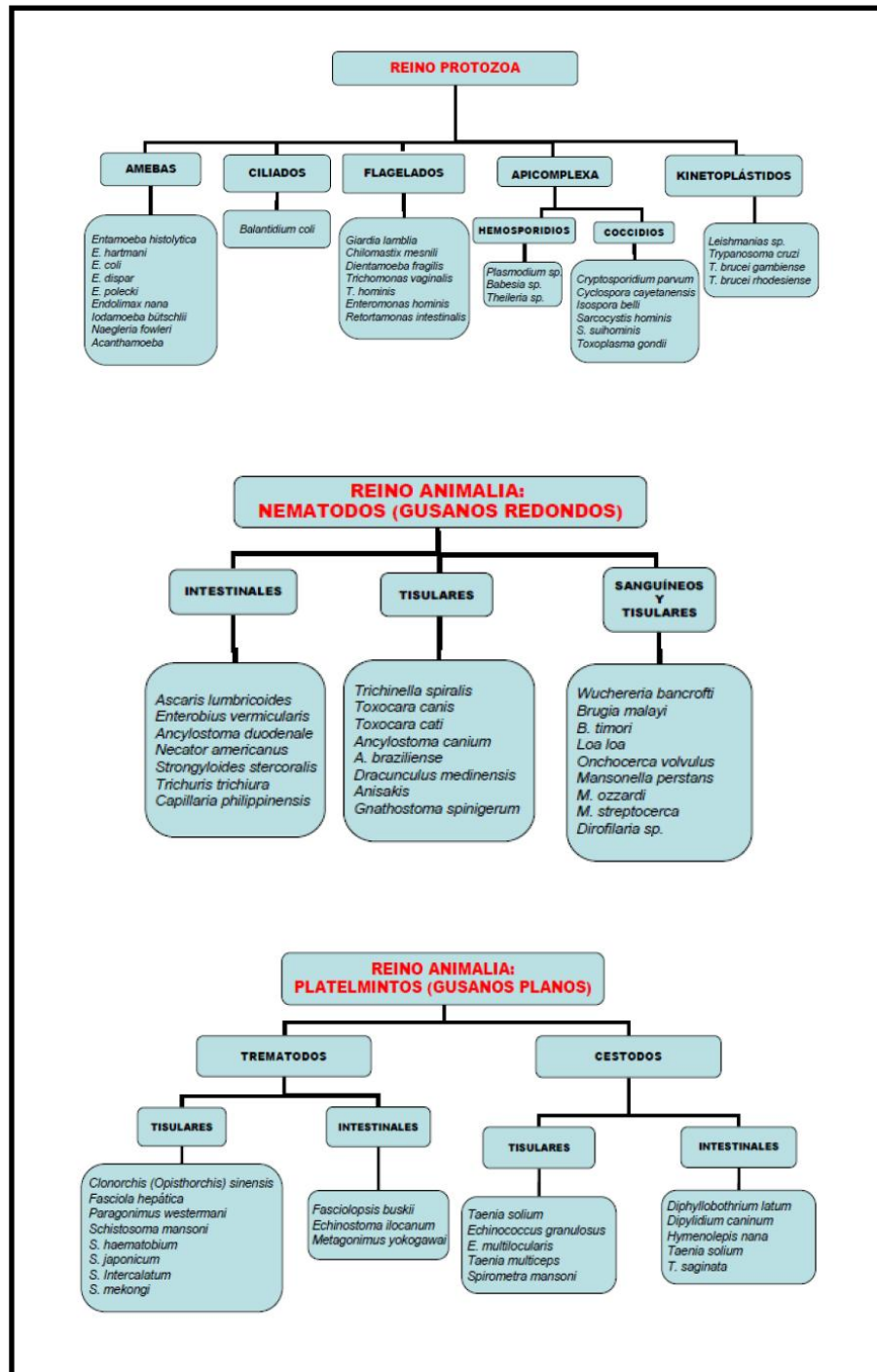


Figura 1: Clasificación esquemática de parásitos humanos (protozoos y helmintos) (Cavalier-Smith, 2004).



### 3. Parásitos hemáticos

Los parásitos hemáticos son aquellos que son transmitidos por artrópodos hematófagos y pasan parte de su ciclo biológico en el hospedador vertebrado en la sangre, bien libres como los tripanosomas y las filarias o parasitando diferencialmente células sanguíneas como *Leishmania* o *Plasmodium* que infectan leucocitos y eritrocitos respectivamente. Los parásitos hemáticos se incluyen en dos grandes grupos: el de los protozoos representados por los géneros *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Babesia*, y el de las filarias, pertenecientes a la clase Nematoda, que incluiría a *Brugia sp.*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa* y *Mansonella sp.* aunque frecuentemente son especies tisulares también se pueden encontrar en sangre (las microfilarias) (Walther & Muller, 2003; Rosenblatt, 2009).

A continuación se hace una pequeña reseña de ellos, centrándose con mayor profundidad en aquellos que son de interés en este trabajo, el género *Plasmodium* y el grupo de las filarias hemáticas y cutáneas por su estrecha relación y su presencia esporádica en sangre.

El género *Babesia* causa la babesiosis, es una zoonosis que afecta a diversos animales (ciervos, vacas y roedores), el ser humano actúa como organismo anfitrión accidental. *Babesia microti* es la causa habitual de babesiosis en EEUU, la mayoría de las infecciones son asintomáticas o leves. En Europa, *B. divergens* ha sido detectada con más frecuencia, causa infecciones graves, muchas veces mortales en individuos sometidos a esplenectomía. La infección se transmite a través de garrapatas infectadas de *Ixodes*. Aunque también se han referido casos de infecciones por transfusión sanguínea (Lau, 2009). El diagnóstico de elección es el examen de extensiones sanguíneas y hay que diferenciarlo de *Plasmodium*. En caso de parasitemia baja se inocula la sangre infectada al hámster, un animal muy vulnerable a la infección. También existen pruebas serológicas para el diagnóstico.

El género *Leishmania*, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, produce un conjunto de enfermedades denominadas *Leishmaniosis*, que incluye entre otras la leishmaniosis cutánea, la leishmaniosis visceral o Kala azar y la leishmaniosis mucocutánea. Los vectores de *Leishmania* son moscas hematófagas del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomya* en el nuevo mundo. Las especies del género *Leishmania* se agrupan en complejos de especies y subespecies (Donovani, Tropica, Mexicana y Brasiliensis). El diagnóstico se realiza por la visualización del parásito en la dermis en la leishmaniosis cutánea o mucocutánea, o en la punción de órganos en el caso de leishmaniosis visceral. Actualmente existen métodos de diagnóstico avanzado por amplificación genómica y sistemas rápidos de detección de

antígeno que mejoran la sensibilidad y especificidad de los métodos tradicionales (Cruz *et al.*, 2002).

El género *Trypanosoma*, son flagelados hemáticos y tisulares que como *Leishmania* pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*. Dos especies diferentes afectan a humanos, *T. cruzi* que produce la enfermedad de Chagas o *T. brucei* spp. que produce la enfermedad del sueño o tripanosomiasis humana africana (THA) en sus dos formas, THA gambiense y THA rhodesiense producida por *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* respectivamente. Los vectores de la enfermedad de Chagas son insectos heterópteros hematófagos, conocidos como vinchucas, de los géneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* que se distribuyen en América del centro y del sur, aunque zonas del norte también están afectadas. Los vectores de la enfermedad del sueño son las moscas tsé-tsé del género *Glossina* (El Sayed *et al.*, 2000; Stuart *et al.*, 2008). *T. cruzi* puede ser visualizado en las extensiones sanguíneas a comienzos de la fase aguda. Conforme progresa la infección, los organismos dejan el torrente sanguíneo y es más difícil hallarlos aunque se pueden localizar en biopsias de los ganglios linfáticos, hígado, bazo o médula ósea. También se dispone de pruebas serológicas (Freilij *et al.*, 1987; Corral *et al.*, 1996). Para el diagnóstico de *T. brucei* se realiza examen de la sangre, aspirados de ganglios linfático y líquido cefalorraquídeo por microscopía. Se dispone de pruebas serológicas, aunque la notable variabilidad de los antígenos superficiales de los tripanosomas limita su utilidad diagnóstica (Castro-Sesquen *et al.*, 2013; Castro-Sesquen *et al.*, 2014)

### 3.1 Género *Plasmodium* spp.

El género *Plasmodium* son protozoos que pueden infectar a varios hospedadores vertebrados en los que se incluyen primates, roedores, reptiles y aves. En humanos causa la malaria o paludismo y es transmitida por la picadura de hembras infectadas del género *Anopheles*. Cuatro especies de plasmodios pueden causar la infección en humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*), aunque accidentalmente otras especies que infectan naturalmente a monos pueden también infectar a humanos, como *P. knowlesi* o *P. cynomolgi* (Ta *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2014).

Los plasmodios son apicomplexos esporozoos que parasitan las células sanguíneas y, al igual que otros apicomplexos, necesitan dos organismos hospedadores, mosquitos hematófagos donde ocurre la reproducción sexual, y un animal.

### 3.1.1 Epidemiología

La malaria o paludismo según el último informe de la Organización Mundial de la salud (OMS, 2004) produjo 198 millones de casos (intervalo de incertidumbre: 124-283 millones) y 584 000 muertes (intervalo: 367 000-755 000) en 2013. Estas cifras aunque elevadas suponen que la tasa mundial estimada de incidencia de casos de paludismo disminuyó en un 30% entre 2000 y 2013, y la de mortalidad en un 47% (OMS, 2014). Actualmente existen 106 países o territorios en los que se declaran casos de transmisión del paludismo de ellos 64 han conseguido reducir la incidencia de la enfermedad y en 55 esta reducción alcanza el 75%. El único país no africano donde aumenta la incidencia es la República Bolivariana de Venezuela.

*Plasmodium falciparum* es el causante de la mayoría de la morbi-mortalidad, esta última especialmente en niños menores de cinco años en el África tropical, seguido por *P. vivax*, que en los últimos tiempos presenta un incremento de casos fatales (Quispe *et al.*, 2014). El resto de las especies de *Plasmodium* humanas provocan menos del 5% de los casos a nivel global, aunque a nivel local *P. knowlesi* representa más del 50% de los casos de malaria en Malasia y puede llegar a producir malaria severa y ocasionalmente la muerte (Grigg *et al.*, 2014). En el Sudeste asiático, especialmente en Malasia, la malaria por *P. knowlesi* supone un problema emergente de salud pública, que está asociado con un riesgo tres veces mayor de sufrir malaria severa comparado con *P. falciparum* (Barber *et al.*, 2013), y cuya incidencia está aumentando

La distribución de la malaria, que fue endémica en gran parte del planeta, incluyendo parte de Norte América y la gran mayoría de Europa, incluido España, se restringe a actualmente a las zonas tropicales y subtropicales del planeta con una mayor incidencia en el África subsahariana, el sudeste asiático y la región amazónica.

La distribución está intrínsecamente relacionada a la de sus vectores anofelinos y condicionados con el clima en especial para el desarrollo de su ciclo acuático.

*P. falciparum* se distribuye casi exclusivamente en regiones tropicales y subtropicales.

*P. vivax* es el plasmodio humano más frecuente y con distribución geográfica más amplia que incluye regiones tropicales, subtropicales y templadas.

*P. ovale* se distribuye principalmente en África aunque se han dado casos esporádicos en el sudeste asiático y América (Mueller *et al.*, 2007), mientras que *P. malariae* se localiza en todas las zonas endémicas pero en baja prevalencia.

Por último, *P. knowlesi* se circunscribe al sudeste asiático, principalmente Malasia, Vietnam y Tailandia (Subbarao 2011) y que aunque sea una zoonosis tiene un alto interés por presentar casos cuya clínica generalmente es grave o muy grave pudiendo ocasionar la muerte si se retrasa el diagnóstico correcto, algo frecuente en los casos importados (Berry *et al.*, 2011; Barber *et al.*, 2012; Azira *et al.*, 2012).

### 3.1.2 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

El parásito de malaria tiene un ciclo de vida complejo, vive principalmente en las células del hígado y los glóbulos rojos de su hospedador humano, pero cuando está en el mosquito vector se encuentra en las glándulas salivares y en el intestino. Sufrir varias transformaciones a lo largo de su vida. Los estadios de su ciclo biológico se conocen desde hace más de cien años y se denominan en base a su morfología: merozoíto, trofozoíto y gametocito en humanos, y zigoto, ookinete y esporozoíto en mosquitos.

El complejo ciclo biológico de *Plasmodium* significa que el parásito ha tenido que adaptarse a varios hábitats diferentes. Durante este ciclo sufre varios cambios y uno de los más espectaculares es la diferenciación sexual y la formación de gametos masculino y femenino (Coatney *et al.*, 2003).

La infección del ser humano comienza con la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* que introduce esporozoítos con su saliva en el sistema circulatorio. Los esporozoítos son transportados a las células del parénquima hepático, en las que tiene lugar la primera reproducción asexual (esquizogonia). Esta fase de crecimiento se conoce como ciclo extraeritrocitario y dura entre 8-25 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium*. Una revisión sobre la invasión de los hepatocitos, desarrollo y liberación de los merozoítos al torrente sanguíneo se puede encontrar en Graewe *et al.*, (2011).

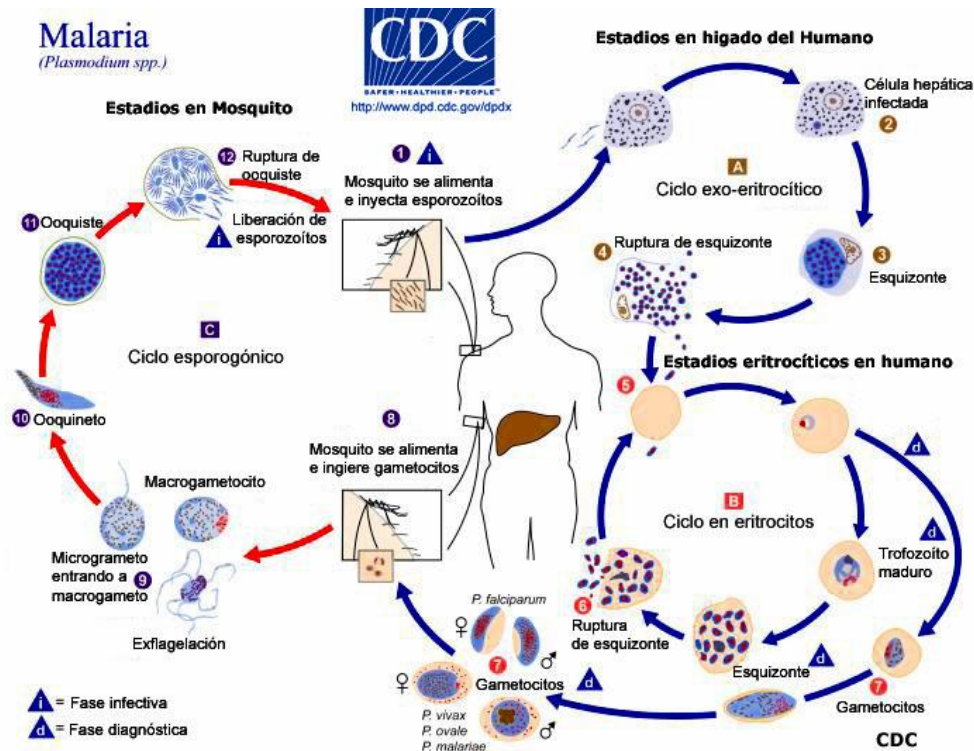


Figura 2: Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. A. Ciclo hepático exo-eritrocítico asexual y asintomático. B. Ciclo eritrocítico asexual y sintomático. C. Ciclo sexual en el mosquito. Modificado del Center for Diseases Control (CDC, Atlanta)

*P. vivax* y *P. ovale* pueden establecer una fase hepática latente en la que los esporozoítos (denominados hipnozoítos o formas latentes) no se dividen (Markus, 2011). Estas formas puede dar lugar a una recidiva de la infección meses o años después de la enfermedad clínica inicial (paludismo recidivante) (White, 2011). Los hepatocitos acaban por romperse, liberando los merozoítos que penetran en el sistema circulatorio, se adhieren a los receptores específicos de la superficie de los eritrocitos y penetran en ellos, donde maduran pasando por diferentes fases morfológicas y sucesivas divisiones (esquizogonia secundaria) dando lugar a nuevos merozoitos conformando así el ciclo eritrocítico. Cuando la maduración de éstos es completa, rompen la membrana del eritrocito y liberan hasta 24 merozoitos que en breves segundos invaden nuevos eritrocitos. Es la ruptura de los eritrocitos lo que provoca la mayoría de los síntomas clínicos de la enfermedad. Algunas merozoitos se diferencian en un momento determinado por recibir diferentes señales en macrogametocitos (células reproductoras femeninas) y microgametocitos (células reproductoras masculinas).

Las hembras del mosquito al tomar sangre, como fuente proteica para el desarrollo de las gónadas ingiere estos gametocitos que una vez en el estómago del vector se desarrollan dando lugar a los gametos maduros que se fusionan para producir el cigoto u ooqueto, que queda quieto en el interior de la membrana

estomacal, éste sufre una primera división meiótica y sucesivas divisiones mitóticas formando el esporoquiste, en cuyo interior se desarrollan los esporozoitos fusiformes. Cuando se rompe el esporoquiste, los esporozoitos son liberados y por vía hemolinfa llegan a las glándulas salivares, donde serán transmitidos al siguiente huésped con la próxima toma de sangre por parte del vector (Farrar *et al.*, 2014). La producción de gametocitos y su maduración en el hospedador humano y el vector son las fases clave del ciclo de vida del parásito (Tibúrcio *et al.*, 2015).

### 3.1.3 Patología

La patología y gravedad de la enfermedad está directamente relacionada con la especie infectante y con el nivel inmunológico del hospedador.

La especie que produce la patología más grave es *P. falciparum* seguida por *P. knowlesi* (William *et al.*, 2011; Sabbatani *et al.*, 2012). La malaria por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* causa infección crónica en humanos (Leclerc *et al.*, 2004).

De todos los plasmodios, *P. falciparum* es el que tiene el periodo de incubación más corto (7-10 días). Después de los primeros síntomas de tipo gripal, *P. falciparum* produce con rapidez escalofríos y fiebre, acompañado de náuseas, vómitos y diarrea importantes. La periodicidad de los episodios es terciana (36-48 horas) que se corresponde con el tiempo del ciclo eritrocítico. El aumento progresivo del número de eritrocitos infectados y destruidos produce detritos celulares tóxicos, adhesión de los eritrocitos al endotelio vascular y a los eritrocitos vecinos y formación de trombos capilares por masas de eritrocitos, plaquetas, leucocitos y pigmento palúdico produciendo una enfermedad fulminante, que puede dar lugar al fallecimiento. Las patologías más graves asociadas a la infección por *P. falciparum* son:

- i) El **paludismo cerebral** debido al taponamiento de los capilares por acumulación de pigmento palúdico y por masas de células puede conducir al coma y la muerte.
- ii) Las **afectaciones renales**, debido a la hemólisis intravascular rápida que ocasiona una acusada hemoglobinuria y puede causar insuficiencia renal, necrosis tubular, síndrome nefrótico y muerte.
- iii) La **afectación hepática** se caracteriza por dolor abdominal, vómitos biliosos, diarrea grave y rápida deshidratación.

*P. vivax* tiene un periodo de incubación de 10-17 días, el paciente presenta síntomas inespecíficos de tipo gripal (cefalea, mialgias, fotofobia, anorexia, náuseas y vómitos). Al progresar la infección, aumenta el número de eritrocitos rotos que liberan merozoítos, así como componentes celulares tóxicos y hemoglobina, a la circulación. En esta fase se produce el cuadro típico de malaria: escalofríos, fiebre (39,5-41°C) y

temblor. Estos paroxismos suelen repetirse de forma periódica (48 horas) por lo que se conoce como paludismo terciano benigno, frente al maligno producido por *P. falciparum*, porque la mayoría de los pacientes toleran los episodios y pueden sobrevivir durante años sin tratamiento.

Sin embargo, si no se tratan, las infecciones crónicas pueden conducir a lesión cerebral, renal y hepática a causa del pigmento palúdico y taponamiento de capilares por acumulaciones de eritrocitos agregados (Mendonca *et al.*, 2015)

*P. ovale* produce síntomas leves de malaria con fiebre, escalofríos, aunque en algún caso puede estar asociado a patología más severa (Rojo-Marcos *et al.*, 2008).

Actualmente se considera *P. ovale* dimórfico o que está constituido por dos subespecies que co-habitan en África y Asia, y que no recombinan genéticamente, *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*. Estas subespecies se pueden diferenciar genéticamente en base al gen de la subunidad pequeña del ADN ribosómico (ssrARN o 18S rRNA) y el ADN mitocondrial (Sutherland *et al.*, 2010) pero no así morfológicamente que son indistinguibles. Aparentemente no hay diferencias en los signos y síntomas clínicos, sin embargo aquellos pacientes con *P. o wallikeri* se ha visto que desarrollan antes los síntomas (periodo de latencia menor), la transmisión es más fácil, los relapsos son más frecuentes y hay un número medio superior de pacientes con síntomas que aquellos con *P. ovale curtisi* (Rojo-Marcos *et al.*, 2014).

El periodo de incubación de *P. malariae* es el más largo (18-40 días), y en ocasiones se prolonga durante meses o años. Los primeros síntomas son de tipo gripal y la fiebre se repite cada 72 horas (paludismo cuartano). Las infecciones no tratadas pueden persistir hasta 20 años pero no son causa de malaria severa (Vinetz *et al.*, 1998).

*P. knowlesi*, aunque considerado una zoonosis se incluye por su interés ante el aumento de casos en el sudeste asiático y por el incremento en el número de casos importados en regiones no endémicas (Ta *et al.*, 2010). *P. knowlesi* se agrupa filogenéticamente en el grupo de *P. vivax*, pero no presenta hipnozoítos aunque sí necesita del receptor de Duffy para invadir al glóbulo rojo (Pain *et al.*, 2008). Experimentalmente se ha visto que el periodo prepatente (el tiempo que transcurre desde la infección hasta que se detectan el parásito mediante las pruebas pertinentes) es de 9-12 días, momento en el que aparecen también los síntomas coincidiendo así periodo prepatente y de incubación.

Una de las características especiales de *P. knowlesi* es la duración de su ciclo eritrocítico que tan sólo es de 24 horas, por lo que si no se controla y no se trata a tiempo puede provocar hiperparasitemias que desembocan en malaria severa y en los peores casos, la muerte del paciente. Los síntomas de la infección son inespecíficos,

similares al resto de especies de *Plasmodium* que causan malaria, fiebres, en este caso diarias, y escalofríos son las características más dominantes, mientras que dolor de cabeza, mialgias, malestar general y poco apetito están presentes habitualmente. (Vadivelan & Dutta, 2014; Yusof *et al.*, 2014)

### 3.1.4 Tratamiento

Actualmente la OMS recomienda el tratamiento combinado basado en derivados de la artemisina (ACT: Artemisin Combined Treatment) debido a la extensión de la resistencia a los antimaláricos más comunes aunque recientemente también han aparecido resistencia a la artemisina combinada con mefloquina y piperquina en la zona entre Camboya y Tailandia (WHO, 2015). Esta recomendación no está extendida y su implantación en las zonas endémicas es complicada por su mayor coste y la falta de disponibilidad y distribución de los tratamientos en las zonas alejadas de los puntos de distribución. La artemisina y sus derivados **artemeter** y **artesunato** son los antimaláricos más activos de los que se dispone actualmente. Disponen de eficacia terapéutica frente a pequeñas formas anulares y esquizontes en proceso de maduración de *P. vivax* y *P. falciparum*, estadios que presentan menor sensibilidad a las quinolonas o quinina. También son capaces de reducir el porte de gametocitos de *P. falciparum*, al contrario que el resto de antimaláricos a los que estas formas son resistentes. Poseen una elevada eficacia cuando se combinan con mefloquina, halofantrina y lumefantrina como tratamiento de la malaria grave causada por *P. falciparum* resistente a diversos fármacos (Perez-Molina *et al.*, 2010; Askling *et al.*, 2012)

El tratamiento de la malaria importada, ante el aumento de las resistencias a los diferentes antimaláricos, se fundamenta en los antecedentes de viajes a zonas endémicas y en la gravedad de los síntomas. Recientemente José Muñoz liderando el grupo de malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) han realizado una revisión sobre el diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España (Munoz *et al.*, 2015).



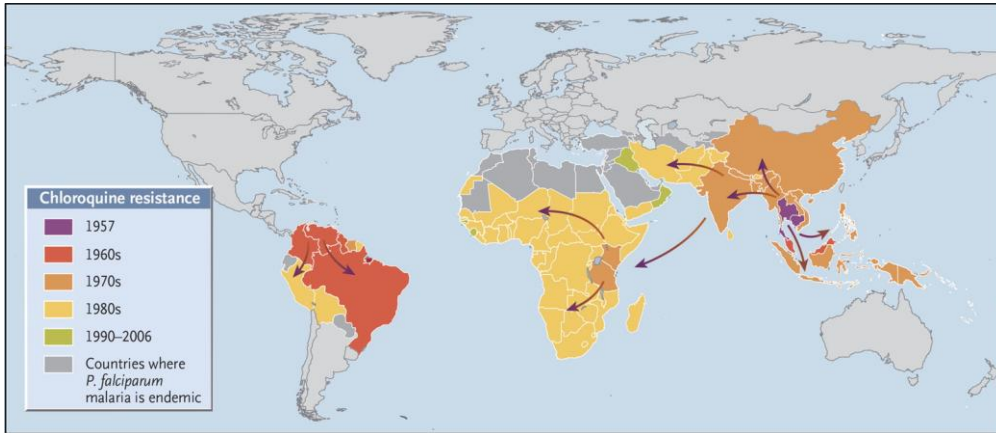


Figura 3: Evolución histórica de la resistencia de *P. falciparum* a cloroquina. Extraído de Packard, 2014.

En general se recomienda tratar a todo paciente sintomático con una prueba diagnóstica positiva, a pacientes asintomáticos con gota gruesa o PCR positivas para Malaria y a paciente sintomático con alta sospecha diagnóstica de malaria grave y dificultades o retrasos para acceder a las pruebas diagnósticas. En estos casos, y debido a la alta morbi-mortalidad asociada, el tratamiento antipalúdico debe instaurarse de forma urgente sin esperar a la confirmación parasitológica. Este tratamiento deberá ser intravenoso cuando el paciente presente intolerancia oral o algún síntoma de malaria grave (alteración del nivel de conciencia, postración, múltiples convulsiones, insuficiencia respiratoria aguda, shock, ictericia, sangrado espontáneo, hipoglucemia, hemoglobinuria o insuficiencia renal aguda, entre otros).

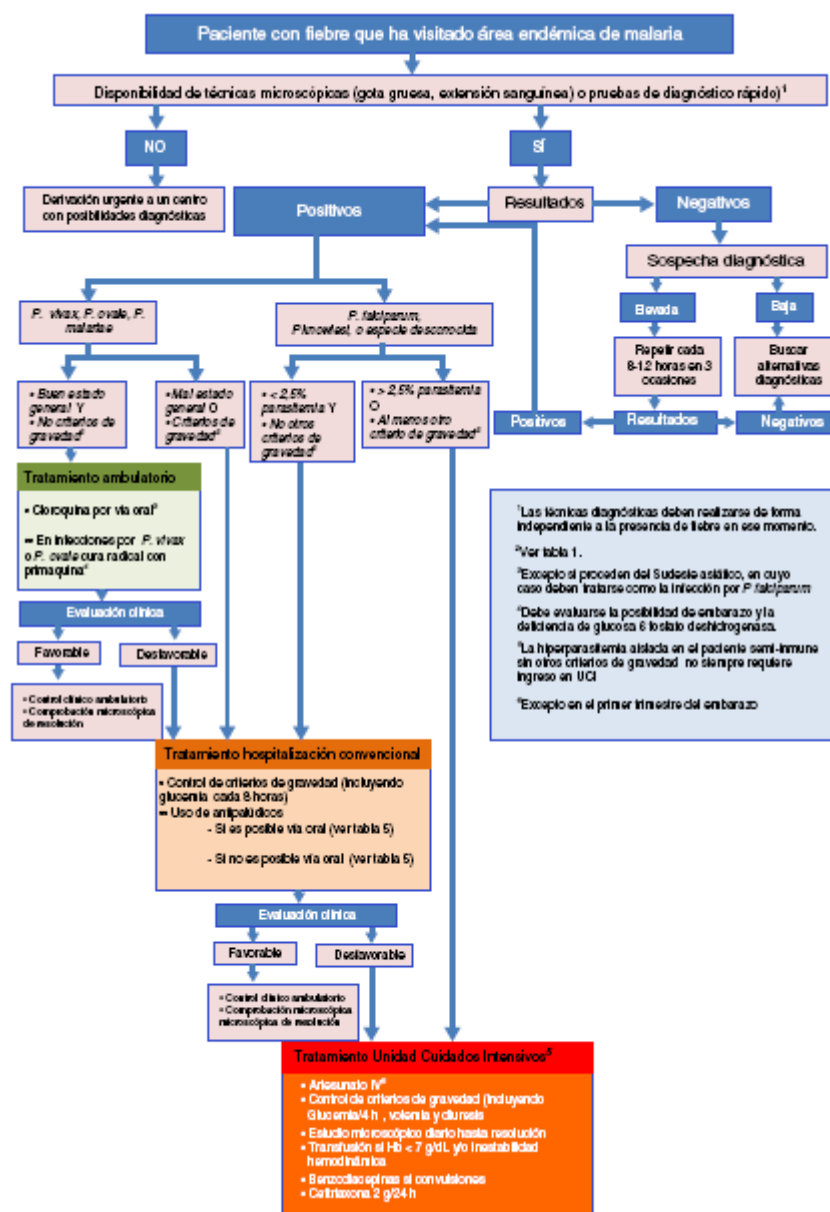


Figura 4: Algoritmo de diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España. Extraído de Muñoz *et al.*, (2015).

Los fármacos de elección para el tratamiento de *P. falciparum* tienen eficacia similar y superior al 95%. Se ha de tener en cuenta que las combinaciones con artemisininas han mostrado una mayor rapidez en el aclaramiento de la parasitemia. En el momento actual el uso de dihidroartemisinina-piperaquina, atovuacuna-proguanil, o artesunato-lumefantrina en base a su eficacia son la recomendaciones como tratamiento de primera elección (Muñoz *et al.*, 2015). El uso de quinina oral para el tratamiento de la malaria sin criterios de gravedad ha quedado relegado a última opción, dado que el perfil de seguridad de las otras combinaciones es más adecuado (Achan *et al.*, 2011; Keating, 2012).

Cloroquina es el fármaco de elección para el tratamiento de la infección por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, seguida de primaquina para la curación radical por eliminación de las formas tisulares, en los casos de *vivax* u *ovale*-malaria. Los pacientes con infección por *P. vivax* resistente a cloroquina pueden recibir tratamiento con quinina+doxiciclina, clindamicina o mefloquina, o atovacuona-proguanil (Perez-Molina *et al.*, 2010).

La infección por knowlesi se trata eficazmente con cloroquina o mefloquina no presentando resistencia a ningún fármaco, aunque se recomienda el uso de terapias combinadas para su tratamiento en caso de malaria grave, se debe seguir las mismas pautas que con la malaria por *P. falciparum* (Vadivelan & Dutta, 2014).

### 3.1.5 Evolución filogenética y genoma de *Plasmodium spp.*

Para entender bien la evolución del género *Plasmodium* y la relación entre cada una de las especies de *Plasmodium* humano hay que recurrir a la filogenia molecular (Nishimoto *et al.*, 2008; Coatney *et al.*, 2003).

La filogenia de *Plasmodium* es controvertido, los árboles filogenéticos que utilizan distintos marcadores moleculares no son consistentes los unos con los otros. Los marcadores moleculares más utilizados son: la subunidad pequeña del RNA ribosomal (ssurRNA o 18S rRNA), citocromo B mitocondrial (CytB), proteasa caseinolítica apicoplasto (ClpC), proteína del circunsporozoíto (CSP), y antígeno 9 de la superficie del merozoíto (MSP9). De todos los marcadores descritos, el más usado para describir árboles filogenéticos es el 18S rRNA tipo A (asexual, estadio trofozoíto), cuyas secuencias son las de mayor disponibilidad en el GenBank (Wirth DF, 2002; Rooney AP, 2004).

A diferencia de otros eucariotas, los parásitos de malaria tienen copias del gen ribosomal (rRNA) que varían en su secuencia y se expresan en momentos diferentes del ciclo biológico (Li *et al.*, 1997). En general se encuentran dos formas el tipo S, expresado fundamentalmente en el mosquito vector, y el tipo A expresado principalmente en el hospedador humano. Existe un tercer tipo que es el tipo O (estadio ooquiste en el mosquito) que sólo ha sido descrito en *P. vivax* (Nishimoto *et al.*, 2008).

La reconstrucción filogenética se realiza principalmente con la forma A de la subunidad pequeña del ARN ribosómico. Algunos autores sugieren que *P. falciparum* comparte un ancestro común con los parásitos de malaria de aves (Waters *et al.*, 1991), y que el cambio de hospedadores de aves a humanos tuvo lugar a principios

"

del desarrollo de la agricultura, cuando el hábitat de los humanos se asentó hace 10.000 años. *P. vivax* parece ser el parásito más reciente según la filogenia del 18S rADN, incluido en el mismo subgrupo que *P. simium*, *P. cynomolgi* y *P. fieldi*. Esto sugiere que *P. vivax* procede de Asia. Desde el punto de vista biogeográfico, se propone que *P. simium* (parásito de malaria de monos del Nuevo Mundo) deriva de *P. vivax* (Li *et al.*, 2001). La hipótesis es que *P. vivax* fue introducido en las Américas en dos ocasiones diferentes: la primera fue la migración de humanos desde Asia en la era pre-Colombiana, y la segunda fue durante la conquista Europea. *P. simium* se originaría en la primera entrada de *P. vivax* en las Américas, mientras que el *P. vivax* del Nuevo Mundo surgiría por la entrada de los europeos. De igual manera ocurre con *P. brasilianum*, cuya secuencia es muy próxima a la de *P. malariae*, también pudo haberse originado por una transferencia de parásito de humano a monos del Nuevo Mundo.

Por lo general, se sabe que la zoonosis existe y que los primates no-humanos constituyen un reservorio de patógenos humanos, de igual manera que la antropozoonosis (del hombre al animal) también hay que considerarlo (Leclerc *et al.*, 2004).

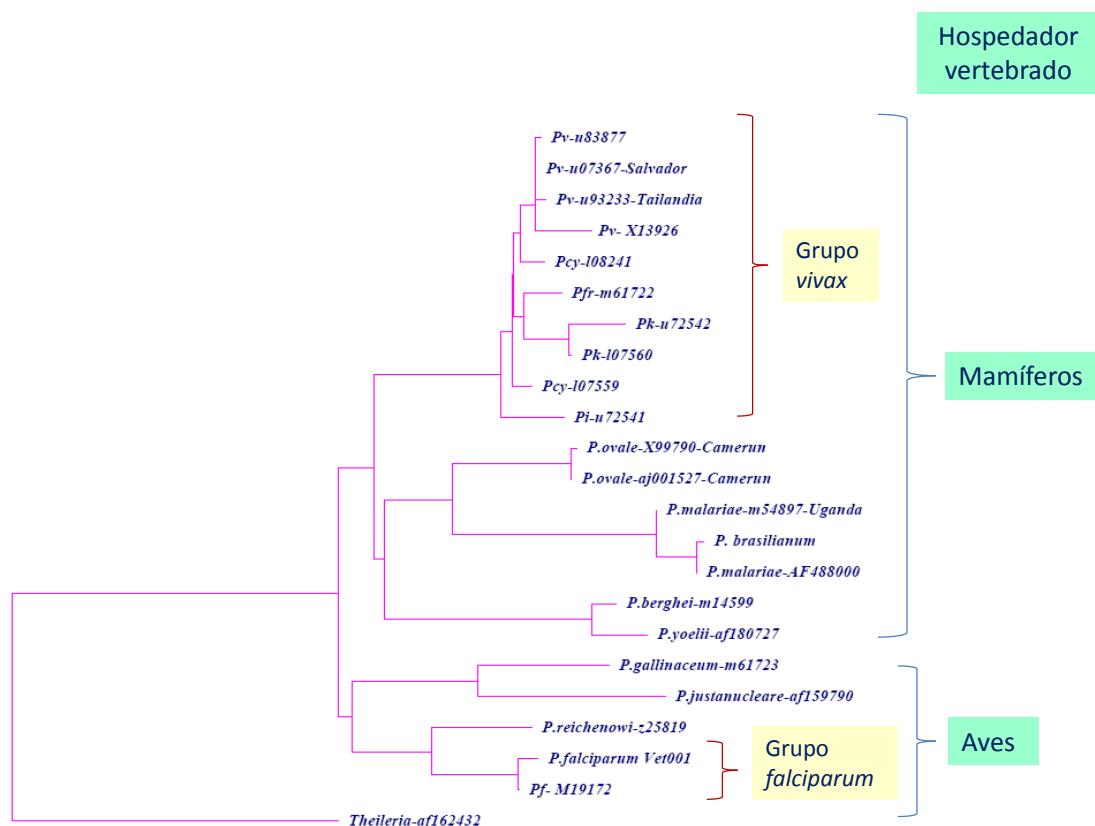


Figura 5: Árbol filogenético de las especies de *Plasmodium*. Modificado de Ta *et al.*, 2010)

Cada genoma nuclear de *Plasmodium* tiene unos 23 megabases (Mb) distribuido en 14 cromosomas, tiene separado el genoma mitocondrial (6 Kb) y plastidio (35 Kb). Son parásitos haploides en la mayoría de su ciclo (Conway, 2007; Ersfeld, 2003). La composición total de bases G+C es de 37,5%. Tiene más de 5.000 genes codificantes de proteínas (Pain, 2008; Ersfeld, 2003).

Una característica del genoma de *P. falciparum* son las regiones finales de los cromosomas, donde existen familias de genes que codifican proteínas de superficie, como los genes *var*. Estas proteínas, o antígenos, a veces son reconocidos y por tanto estimulan el sistema inmune humano. Sin embargo, tienen gran capacidad para cambiar porque intercambian parcialmente material que hay al final de cada cromosoma (telómeros). Estos telómeros tienen una compleja disposición y esto facilita el intercambio de antígenos y la evasión del sistema inmune, a pesar de provocar mucha actividad inmunogenética en el hospedador (Wirth, 2002).

El genoma del parásito *P. falciparum* ha sido completamente secuenciado después de seis años de trabajo (Gardner *et al*, 2002; Kissinger *et al.*, 2002).

### 3.2 Filarias

Las filarias son nematodos finos y largos, parásitos de la sangre, la linfa y los tejidos subcutáneos y conectivos que producen un conjunto de enfermedades en el humano conocidas como filariosis. Su transmisión se produce por insectos hematófagos generalmente dípteros (mosquitos y moscas) que actúan como vectores. (Walther *et al.*, 2003; Cross, 1996; Eberhard *et al.*, 1991).

Las filarias se clasifican dependiendo de los tejidos que parasitan las formas adultas en linfáticas, dérmicas y peritoneales. Las especies de filarias de interés clínico para los humanos son *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *B. timori*) que pertenecen al grupo de las linfáticas y que producen la filariosis linfática; *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* y *Mansonella streptocerca* que se engloban dentro de las filarias dérmicas, y que producen la onchocercosis, la loasis y la mansonelosis, respectivamente y por último *Mansonella perstans* y *M. ozzardi* que invaden las zonas peritoneales y que también producen la mansonelosis. Todas ellas presentan estadios larvales, conocidos como microfilarias, que circulan en sangre o en tejido subcutáneo que son las formas infectivas para los vectores (Walther & Muller, 2003; Cross, 1996; Eberhard *et al.*, 1991)

### 3.2.1 Epidemiología

La filariasis es endémica en regiones tropicales de Asia, África, América Central y del Sur, poniendo en riesgo a más de 1 100 millones de personas, con 120 millones de personas afectadas en 83 países, más del 60% de los cuales residen en el sureste de Asia según el último informe de la OMS sobre filariosis. Las filariosis humanas producen unos 6,3 millones de años de vida perdidos por discapacidad. El hombre es el reservorio o fuente de infección primaria para todas las filariosis humanas. El mecanismo de transmisión se efectúa exclusivamente por medio de hospedadores intermediarios, los cuales varían dependiendo del parásito.

La filariosis linfática es producida por *W. bancrofti*, *B. malayi* y *B. timori*, siendo la primera responsable de más del 90% de los casos, mientras que *B. timori* es con mucho la menos prevalente. Afecta a 120 millones de personas en regiones tropicales y sub-tropicales de Asia, África, oeste del Pacífico, y zonas del Caribe y América del Sur, con las elefantiasis como la forma clínica más grave. *W. bancrofti* se localiza en áreas tropicales y subtropicales, es endémico en África central, a lo largo de la costa mediterránea, y en muchas partes de Asia. También existe en Haití, Trinidad, Surinam, Panamá, Costa Rica y Brasil (Chandy *et al.*, 2011). *Brugia spp.* se distribuye sobre todo en Malasia, India, Tailandia, Vietnam y zonas de China, Corea, Japón y muchas islas del Pacífico. Se conocen reservorios animales como gatos y monos lo que dificulta el control de la enfermedad (Cross, 1996; Kimura, 2011).

Las microfilarias de *W. bancrofti* y *Brugia spp.* tienen periodicidad nocturna coincidiendo con el momento de mayor actividad de los vectores que son mosquitos de los géneros *Culex*, *Anopheles* y *Aedes* (Walther & Muller, 2003).

La oncocercosis es producida por *O. volvulus* y transmitida por moscas del género *Simulium*. La distribución se restringe a zonas tropicales principalmente África donde se concentra el 99% de las personas infectadas, aunque también hay focos en cuatro países de América Central y Sur (Brasil, Guatemala, México y Venezuela). Se estima que hay 25 millones de personas infectadas en el mundo, especialmente en África, de las que 300 000 presentan ceguera, y 800 000 muestran algún tipo de disfunción ocular, y muchas más con lesiones cutáneas graves; por otra parte, se supone que cerca de 123 millones se encuentran en riesgo de parasitación. La oncocercosis produce ceguera al 5% de las personas infectadas por lo que es conocida como ceguera de los ríos (Maia-Herzog *et al.*, 1999).

La loasis es producida por *L. loa* y transmitida por tábanos del género *Chrysops*. Su hábitat es la selva tropical de África y se distribuye en África occidental, la cuenca del Congo y ciertas zonas de Nigeria. En las zonas de alta endemicidad,

donde habitan 14,4 millones de personas, el 40% reportan haber tenido un gusano en el ojo, mientras que en las de endemidad media, donde viven unos 15,2 millones, el 20–40% relatan haber sufrido el gusano del ojo en el pasado. Los monos de esas áreas actúan como reservorios en el ciclo vital (Walther & Muller, 2003). Se estima que hay 13 millones de personas afectadas en el África tropical (OMS 2010).

La mansonelosis es producida por filarias del género *Mansonella* (*M. perstans*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca*) y se transmiten por moscas del género *Culicoides*, aunque en algunos focos en Brasil, *M. ozzardi* es transmitido por simúlidos (Tang *et al.*, 2010). No hay buenas estimaciones de la carga de estas enfermedades en el ámbito mundial (Díaz-menéndez *et al.*, 2011). *M. ozzardi* se distribuye exclusivamente en América Central (área peninsular y Caribe) y América del Sur, no conociéndose reservorios animales (Kozek *et al.*, 1983). *M. streptocerca* se distribuye por África, especialmente por el Congo y se han encontrado monos infectados que pueden servir como reservorios (Fischer *et al.*, 1998). *M. perstans* se localiza en el África tropical, aunque hay citaciones de la presencia de *M. perstans* en América del Sur (Ta *et al.*, 2015 sometido). Los chimpancés y gorilas pueden actuar como reservorios en la naturaleza.

### 3.2.2 Ciclo biológico

La infección en el ser humano comienza con la transmisión de larvas infecciosas L3 presentes en la saliva de los mosquitos (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex* y *Mansonia*), moscas (*Simulium spp.*), o tábanos (*Chrysops sp.*)

Las larvas migran desde la zona de la picadura hasta los vasos linfáticos, sangre o permanecen en el tejido subcutáneo, madurando hasta transformarse en parásitos adultos. Entre 3-12 meses después de la exposición inicial, los machos adultos fecundan a las hembras y estas producen microfilarias (envainadas: *W. bancrofti*, *Brugia sp* y *L. loa*; no envainadas: *O. volvulus* y *Mansonella spp.*). La presencia de microfilarias (L1) en la sangre o en la piel es la confirmación parasitaria del diagnóstico de la filariosis. Estas larvas son tomadas por el vector al ingerir sangre del hospedador.

En el mosquito, las larvas pasan por el estómago y los músculos torácicos mientras van madurando y emigran finalmente a la probóscide del insecto. Allí se convierten en larvas de fase tres (L3) que son las infecciosas para el hombre y que son transmitidas con la picadura del vector. La forma adulta puede persistir en el ser humano durante 10 años o más como en el caso de *O. volvulus* (Nanduri *et al.*, 1989).

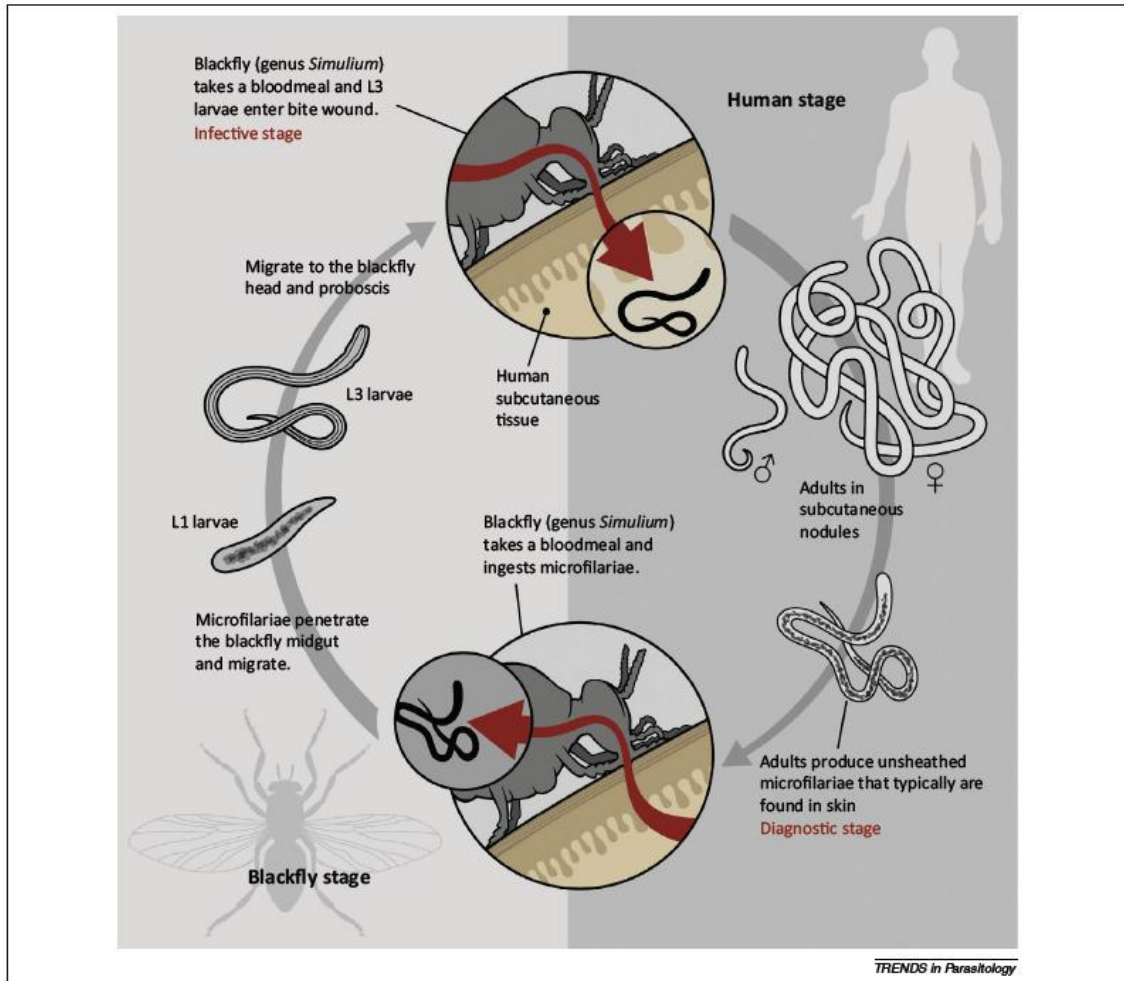


Figura 6: Ciclo biológico de *O. volvulus*. Imagen tomada del artículo de Alhassan *et al.*, *Expanding the MDx Toolbox for Filarial Diagnosis and Surveillance*. Trends Parasitol 2015, 31, 391-400.

### 3.2.3 Patología

El periodo de incubación desde las larvas infecciosas hasta los gusanos adultos varía entre algunos meses y 1 año. Algunos pacientes no muestran signos de enfermedad, a pesar de presentar una alta concentración de microfilarias en las muestras de sangre. Otros debutan con síntomas agudos precoces, como fiebre, escalofríos, linfadenitis, eosinofilia o urticaria.

Se cree que el cuadro agudo está causado por la respuesta inflamatoria frente a la presencia de gusanos adultos en la fase de muda y de parásitos muertos o moribundos.

*W. bancrofti* da lugar a la elefantiasis filariásica. En ocasiones se observan ascitis y derrames pleurales por rotura de los linfáticos distendidos en las cavidades pleural o peritoneal (Harder *et al.*, 1964; Eberhard *et al.*, 1991)



*Brugia spp.* produce elefantiasis de gravedad inferior a la producida por *W. bancrofti* y afecta especialmente a los miembros inferiores, aunque la mayoría son microfilarémicos asintomáticos.

En la onchocercosis o ceguera de los ríos las manifestaciones clínicas se caracteriza por afectación de la piel, el tejido subcutáneo, los ganglios linfáticos y los ojos. Se deben a la reacción inflamatoria aguda y crónica frente a los antígenos liberados por la microfilaria conforme va migrando a través de los tejidos. Cuando aparecen los nódulos en zonas de la cabeza o cuello son más peligrosos porque las microfilarias pueden migrar hasta los ojos con riesgo de ceguera. Se cree que la enfermedad ocular se debe a una combinación de la invasión directa de la microfilaria y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo en el seno de los tejidos oculares. En la piel se observa pérdida de elasticidad, áreas de despigmentación, engrosamiento y atrofia.

Los síntomas de la loasis no suelen aparecer hasta un año después de la infección, puesto que los gusanos tardan mucho en llegar a la fase adulta. Uno de los primeros signos de la infección son los llamados edemas de Calabar (como consecuencia de la reacción alérgica frente a los gusanos o frente a sus productos metabólicos) en las extremidades. Se producen por la migración de los gusanos por los tejidos subcutáneos para dar lugar a extensas áreas nodulares, dolorosas y pruriginosas. Hay presencia de eosinofilia en el 50-70% de los casos.

Las infecciones por *Mansonella* son menos importantes, dado que en numerosas ocasiones cursan sin síntomas, pero también pueden manifestarse con dermatitis, linfadenitis, hidrocele y rara vez obstrucción linfática con elefantiasis (Bregani *et al.*, 2003; Adami *et al.*, 2008; Simonsen *et al.*, 2011).

### 3.2.4 Tratamiento

Desde el punto de vista clínico, la identificación exacta de la especie no reviste una excesiva importancia puesto que el tratamiento de todas las filariosis es idéntico, con la excepción de *O. volvulus* (Thanomsub *et al.*, 2000). El tratamiento de elección para tratar las infecciones por *W. bancrofti* y *Brugia spp.* es DEC (dietilcarbamazina) que se administra por vía oral. Se puede usar en ocasiones combinadas con ivermectina y albendazol. No se han desarrollado vacunas preventivas (Pérez-Molina *et al.*, 2010).

El tratamiento de *O. volvulus* es la extirpación quirúrgica del nódulo encapsulado para eliminar los adultos y detener la producción de microfilarias. El tratamiento es con ivermectina (Mectizan®, Merck), que reduce considerablemente el

número de microfilarias en piel y ojos, por tanto disminuye la posibilidad de desarrollar la oncocercosis incapacitante. Al reducir las microfilarias en piel también se reduce la transmisión. Hasta la fecha no se han descrito casos de resistencias a ivermectina pero hay que considerar la posibilidad cuando se emplea sólo un fármaco con dosis variables y durante un periodo de tiempo tan prolongado.

Para tratar la *L. loa*, la DEC es eficaz frente a los adultos y a las microfilarias. El albendazol y la ivermectina son eficaces para reducir la carga de microfilarias (Mendoza *et al.*, 2009) pero esta última puede provocar reacciones adversas graves. (Ta *et al.*, 2015. Pendiente de ser sometido).

Ivermectina también es el tratamiento de elección para *M. ozzardi*, DEC (dietilcarbamazina) para *M. streptocerca*, mientras que albendazol o mebendazol se emplea para *M. perstans* (Perez-Molina *et al.*, 2010).

### 3.2.5 Evolución filogenética y genoma de *B. malayi*

Una reciente re-clasificación del *Phylum Nematoda* reconoce cinco clados (Blaxter *et al.*, 1998). *Caenorhabditis elegans*, clado V, es el primer nematodo de vida libre no patógeno humano y organismo multicelular que tiene el genoma secuenciado completamente. Dado que la gran mayoría de especies de nematodos tienen el mismo cuerpo básico y un desarrollo muy similar, la presunción es que la estructura, organización, el contenido de genes y la regulación del genoma de *C. elegans* sirviera como modelo exacto para la mayoría nematodos. Esta idea se disipó cuando se publicó el primer borrador del genoma de *B. malayi* (Ghedini *et al.*, 2007). Se seleccionó a *B. malayi* como representante de Filial Genome Project (FGP, 1994) por ser una cepa patógena de humanos fácilmente disponible (Scott & Ghedin, 2009).

El genoma nuclear de *B. malayi* tiene aproximadamente 95 Mb (está el 90% del genoma ensamblado), está organizado en cinco pares de cromosomas, incluido el par de determinación del sexo. Como en la mayoría de las filarias, *B. malayi* también dispone de dos genomas extras: un genoma mitocondrial de 14 Kb y un genoma de una bacteria endosimbionte de 1 Mb. La co-evolución de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* y del nematodo tiene un gran impacto en la naturaleza del genoma de *B. malayi*. La filaria no puede sintetizar purinas de novo, así como no dispone 9 de las 10 enzimas que se requiere para la formación de inosina monofosfato a partir de fosforibosil pirofosfato. La bacteria interviene también en otros procesos importantes como producción de energía, síntesis de esteroides, la muda, procesos de reproducción, participando en muchos procesos fisiológicos y biológicos importantes. Actualmente se usa esta bacteria como diana de los tratamientos frente a la filariasis

linfática ocasionada por *Brugia* y también para otros tipos de filariosis (Coulibaly *et al.*, 2009; Debrah *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2014).

El genoma de *B. malayi* tiene un contenido nucleotídico de 69,5% de A+T y se estima que el número de genes se sitúa entre 14.500-17.800 genes codificantes de proteínas de los que un 20% son específicos de *B. malayi* frente al genoma de *C. elegans* (Scott & Ghedin, 2009):

#### 4. Diagnóstico de las infecciones parasitarias

El diagnóstico de las parasitosis puede ser complicado, especialmente en zonas donde estas parasitosis o nunca fueron endémicas o hace años que no lo son (Rubio *et al.*, 1999). Las manifestaciones clínicas de las parasitosis rara vez son lo suficientemente específicas para que el médico considere la posibilidad de estos procesos y las pruebas habituales de laboratorio pocas veces resultan de utilidad.

El diagnóstico adecuado requiere que el médico considere la posibilidad de la parasitosis, se obtengan las muestras apropiadas y se trasladen al laboratorio dentro del tiempo adecuado. El laboratorio realice de forma competente los procedimientos apropiados para la recuperación e identificación del agente etiológico. Los resultados de las pruebas de laboratorio se comuniquen de forma eficaz al médico. Los resultados sean interpretados de forma correcta por el médico y aplicados para el tratamiento adecuado del paciente.

Además, para la mayoría de enfermedades parasitarias, la selección de la prueba adecuada y su interpretación se basan en la comprensión del ciclo vital del parásito, así como de la patogenia del proceso de la enfermedad en el ser humano.

Se han descrito numerosos métodos para el diagnóstico de las parasitosis. Algunos de ellos son útiles para detectar una amplia variedad de parásitos y otros son útiles para detectar uno o un reducido número de parásitos.

Aunque el elemento clave de la microbiología clínica diagnóstica corresponde al aislamiento del agente patógeno etiológico en el cultivo, el diagnóstico de las parasitosis se elabora casi exclusivamente a partir de la demostración morfológica (normalmente microscópica) de la presencia de los parásitos en el material clínico. Ocasionalmente, la detección de una respuesta humoral específica (diagnóstico serológico) ayuda a establecer el diagnóstico.

Actualmente, la detección de los antígenos del parásito en suero, orina o heces proporciona un método de diagnóstico rápido y sensible para ciertas patologías.

De la misma forma, los nuevos análisis basados en cebadores y sondas de ácidos nucleicos, pueden ser unos excelentes medios para detectar e identificar

parásitos en muestras biológicas como la sangre, las heces, la orina, el esputo y las biopsias tisulares obtenidas a partir de pacientes infectados. En general, es más conveniente para el laboratorio ofrecer un número limitado de pruebas efectuadas de forma competente que ofrecer una amplia variedad de pruebas infrecuentes y mal realizadas. Estas pruebas pueden llegar a aplicarse de forma amplia en el futuro ya que son más rápidas, sensibles y específicas para el diagnóstico de las parasitosis que las utilizadas actualmente.

Debido a que la mayoría de las exploraciones e identificaciones parasitológicas se basan totalmente en el reconocimiento de la morfología característica de los organismos, cualquier entidad que pueda ocultar o distorsionar el aspecto morfológico del parásito puede originar una identificación incorrecta o un diagnóstico erróneo.

#### **4.1. Diagnóstico clínico**

En Parasitología existen dos tipos básicos de diagnóstico, el clínico y el de laboratorio. El diagnóstico clínico es un diagnóstico de presunción y está basado en un conjunto de signos, síntomas y antecedentes epidemiológicos que presenta el paciente. En las regiones endémicas de ciertas parasitosis, un clínico con experiencia y familiarizado con las enfermedades parasitarias de dichas zonas, puede establecer, con relativa facilidad un diagnóstico de presunción cuando los signos y síntomas son típicos.

No sucede así, en cambio, en las regiones en que ciertas enfermedades parasitarias son raras o han sido adquiridas en otras regiones. En estos casos es complicado, si no imposible, establecer un diagnóstico clínico.

La mayoría de las infecciones parasitarias presentan una sintomatología indeterminada con síntomas poco específicos e incluso aquellos que se pudieran considerar exclusivos como la eosinofilia en las helmintiasis, en ocasiones esta ausente u otras parasitosis como la malaria también pueden producirla.

Por estos motivos, el médico debe mantener un elevado índice de sospecha y debe basarse en unos antecedentes detallados de viajes, ingestión de alimentos, transfusiones y características socioeconómicas para sospechar la posibilidad de una parasitosis (Francis *et al.*, 2003).

## 4.2 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico se puede realizar por métodos directos o indirectos. Estos últimos detectan la presencia de anticuerpos frente al parásito, mientras que los métodos directos son aquellos que detectan la presencia del parásito o alguno de sus componentes y se pueden dividir en tres grupos: métodos microscópicos, métodos de detección de antígeno y métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos.

### 4.2.1 Métodos indirectos serológicos

La detección de anticuerpos producidos por la respuesta inmune ante la infección por un microorganismo es uno de los métodos de diagnóstico más extendidos en microbiología bien por métodos de ELISA, de aglutinación o de inmunofluorescencia indirecta.

Las pruebas serológicas para malaria detectan anticuerpos en sangre producidos en respuesta a la infección utilizando inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ensayos de inmunoabsorción (ELISA) (Soler *et al.*, 2003). La serología es útil para la detección de la respuesta inmune humoral específica y proporcionar una estimación de exposición en el pasado pero no es útil para diagnosticar una infección aguda, ya que al persistir los anticuerpos en el tiempo no diferencia infecciones pasadas de actuales. Tampoco es útil en el caso de primo-infecciones debido a que por el tiempo requerido para el desarrollo de anticuerpos, la seroconversión no ocurre hasta pasado un tiempo que puede ser posterior a la aparición de los síntomas graves por lo que no es un buen método para el diagnóstico de rutina de la malaria aguda (Rubio *et al.*, 1999). Además, los antígenos utilizados se limitan a algunas especies, principalmente *P. falciparum* y *P. vivax* (Murphy *et al.*, 2013). Sin embargo, la detección de anticuerpos es muy útil para el cribado de donantes de sangre nativos o viajeros procedentes de zonas endémicas (Benito & Rubio, 2001) y recientemente se está aplicando para la comprobación diagnóstica en pacientes que hayan sido diagnosticados y tratados de malaria pero en los que el diagnóstico es cuestionable.

En el caso de la serología para filarias, se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar pruebas para detectar anticuerpos usando antígenos recombinantes, bien de forma individual o combinados en diferentes cócteles.

En el caso de la oncocercosis los primeros recombinantes utilizados fueron los antígenos Ov33 y Ov16. De todos ellos, uno de los que más se usa es Ov16, que se emplea en la detección de anticuerpos humanos IgG4 específicos frente el antígeno. La OMS incluye la detección de IgG4 anti-Ov16 entre sus criterios epidemiológicos

para certificar la eliminación de la oncocercosis humana (rangos de infección en niños < 0,1%, 95% confianza). Los anticuerpos anti-Ov16 se desarrollan mucho antes de la aparición de las microfilarias en la piel, de ahí su utilidad para detectar infecciones prepatentes en población supuestamente no expuesta. Por el contrario, los niveles de anticuerpos anti-Ov16 disminuyen lentamente después del tratamiento, por lo que no se puede aplicar a personas previamente expuestas.

El sistema Ov16-IgG4 se puede emplear en diferentes formatos, como ELISA o en test de tarjeta rápida (Antibody card test) (Lobos *et al.*, 1991; Weil *et al.*, 2000; Lipner *et al.*, 2006). Este último permite utilizar como muestra tanto sangre completa como suero y es de gran utilidad, por su sencillez, en trabajos de campo. La prueba de la tarjeta Ov-16 está disponible comercialmente a través de la empresa SD Bioline. Por las razones mencionadas anteriormente no se puede utilizar, en exclusividad, como herramienta diagnóstica. (Jiménez *et al.*, 2015)

La detección serológica de la filariasis linfática se realiza principalmente por LIPS por obtenerse muy buenos resultados utilizando un único antígeno recombinante Wb123. Esta proteína, correspondiente a una serpina expresada en la larva infectiva, de *W. bancrofti*. La técnica muestra una sensibilidad del 98-100% y una especificidad, frente a otras filarias (*O. volvulus*, *L. loa*, *M. perstans*), de entre 84-100% cuando se determina IgG anti-Wb123 y de entre 98-100% cuando se determina IgG4 anti-Wb123. Como muestra se puede utilizar sangre completa, suero, muestra procedente de tarjeta y saliva. Tiene el inconveniente que al igual que en los casos anteriores, no permite diferenciar infecciones nuevas de infecciones pasadas (Kubofcik *et al.*, 2012).

No hay formatos comerciales para la detección y/o caracterización de loasis y mansenosis. En el caso de la primera un formato ELISA frente a una fracción repetida de una proteína recombinante (15r3) muestra resultados prometedores, pero los estudios realizados se han realizado con pocas muestras y necesitan una validación más adecuada (Azzibrouck *et al.*, 2010).

## **4.2.2 Métodos directos**

### **4.2.2.1 Microscopía**

Se preparan dos tipos de extensiones de sangre para el diagnóstico de las parasitosis en sangre: extensiones finas y gotas gruesas. Aunque las preparaciones en fresco de sangre pueden estudiarse en busca de parásitos móviles (microfilarias), la mayoría de laboratorios proceden directamente a la preparación de extensiones finas y gotas gruesas para su tinción.

En las extensiones finas, la sangre se extiende sobre el portaobjetos en una capa fina (unicelular) y los eritrocitos aparecen intactos después de la tinción. En la gota gruesa, los eritrocitos son lisados con anterioridad a la tinción y únicamente son visibles los leucocitos, las plaquetas y en caso de estar presentes, los parásitos. Las extensiones gruesas permiten examinar una mayor cantidad de sangre, aumentando la posibilidad de detectar infecciones con parasitemias bajas. La utilización correcta de esta técnica precisa una gran experiencia y destreza (Torrus *et al.*, 2015)

En algunas ocasiones se pueden utilizar otros métodos de concentración de sangre para la detección de infecciones con parasitemias bajas, como son centrifugación del microhematocrito y filtración de membrana (microfilarias).

La tinción de Giemsa es particularmente útil para la tinción de protozoos (plasmodios y tripanosomas), sin embargo la vaina de las microfilarias no siempre se tiñe por este método, en este caso pueden usarse tinciones basadas en la hematoxilina.

Según la presentación clínica y las consideraciones epidemiológicas, deben examinarse tejidos o líquidos corporales diferentes a la sangre. Las exploraciones en fresco con suero fisiológico de muestras cutáneas superficiales son muy útiles para la detección de microfilarias de *O. volvulus*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca*.

En el diagnóstico de malaria se considera que el examen microscópico de la gota gruesa teñidos con Giemsa, Wright o Field como la prueba de referencia o gold standard. La sangre se obtiene por punción en un dedo o lóbulo de la oreja, son las muestras ideales porque la densidad de trofozoítos o esquizontes es mayor en sangre de área rica en capilares. La sangre obtenida por venipunción tiene que ser colectada en tubos con heparina o EDTA (anticoagulantes) si la muestra se va a usar en un corto periodo de tiempo para prevenir la alteración de los glóbulos blancos y de los parásitos de malaria (Tangpukdee *et al.*, 2009).

En manos muy expertas, la microscopía tiene un límite de detección de 5-20 parásitos/ $\mu$ l (0,0001%), pero la media de límite de detección en la mayoría de los microscopistas es de 100 parásitos/ $\mu$ l (0,01%) o mayor, por tanto es limitado su uso en casos de baja carga parasitaria (Torrus *et al.*, 2015). Existen estudios que demuestran que incluso en infecciones submicroscópicas, los mosquitos pueden infectarse y potencialmente pueden transmitir la malaria (Moody, 2002).

La microscopía tiene el inconveniente de tener una baja sensibilidad y especificidad, a la vez que una alta subjetividad del observador. En una reciente revisión se vio que más de un 17% de las extensiones de sangre examinados al microscopio fueron corregidos después de ser testados por PCR (Rubio *et al.*, 2002; Ndao *et al.*, 2004; Nankabirwa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014).

El rango de diagnósticos erróneos por microscopía varía desde un 20% a 50% para *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. Las infecciones mixtas son difíciles de diagnosticar correctamente, especialmente cuando existen diferencias en la proporción de estadios entre las especies. La causa de los errores son múltiples como tinciones defectuosas, presencia de parásitos degradados. Los errores en la interpretación pueden ser también por la superposición de plaquetas sobre los glóbulos rojos o tinción defectuosa (el pH óptimo de tinción es 7.2) (Perandin *et al.*, 2003). La gota gruesa no es el método de elección para cuantificar e identificar especies de *Plasmodium* porque infravalora la densidad parasitaria en el orden de un logaritmo y puede errar en la identificación de especie incluso por microscopistas expertos. Los trofozoítos maduros de *P. falciparum* pueden confundirse con trofozoítos de *P. malariae*, infecciones de *P. vivax* y *P. ovale* pueden confundirse entre sí a pesar de las muchas diferencias morfológicas (Coleman *et al.*, 2006; Runsewe-Abiodun *et al.*, 2012; Barber *et al.*, 2013)

En la Tabla 2, incluida en Torrus *et al.* (2015) se pueden encontrar las características morfológicas diferenciadoras de las diferentes especies de *Plasmodium* que afectan a humanos. Estos datos apoyan la necesidad de un nuevo método de diagnóstico fidedigno, ultrasensible y específico para malaria para reemplazar la gota gruesa como método de referencia.



	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
<b>Características del eritrocito</b>	No agrandado. Redondo, a veces crenado. Color normal, pero también más oscuro.	Más grande. Redondo u oval, extraño. Color normal a pálido.	No agrandado. Redondo. Color normal	Más grande. Redondo u oval, a menudo fimbriado. Color normal.	No agrandado. Redondo. Color normal.
<b>Pigmento</b>	Negro o marrón oscuro; asexual con una o dos masas; sexual con varias barritas.	Gránulos marrones pequeños esparcidos por el citoplasma	?	Intermedio entre <i>P. vivax</i> y <i>P. malariae</i> .	Gránulos negros o marrones dispersos
<b>Punteado</b>	Manchas de Maurer (puntos rojos grandes)	Puntos de Schüffner, pequeños y numerosos puntitos rojos.	?	Puntos de Schüffner, pequeños y numerosos puntitos rojos	Puntos de Ziemann, pocos puntos pequeños, difíciles de detectar
<b>Anillo</b>	Pequeño y delicado; 2 puntos de cromatina; múltiples anillos. Formas appliqués. 1-1,7 µm	Relativamente grande; un gránulo cromatina, a veces 2; a veces dos anillos en una célula. Forma ameboide. 4 µm o más.	Trofozoito temprano: como <i>P. f</i> Trofozoito tardío: como <i>P. m</i>	Compacto, un punto de cromatina. Trofozoito ameboide. 4 µm o más.	Compacto, un punto de cromatina; trofozoito en banda. 2-2,6 µm
<b>Esquizonte</b>	Tamaño medio; compacto; raro en sangre periférica. 16-24 merozoitos.	Grande, ameboide, pigmento fino. 14-20 merozoitos.	Muy similares a <i>P. m</i> . Muy pigmentados. 16 merozoitos.	Tamaño medio, compacto, pigmento disperso. 6-12 merozoitos.	Pequeño, compacto, pigmento central. 8-12 merozoitos.
<b>Gametocito</b>	Grande y alargado. Forma banana o salchicha.	Esférico, compacto, más grande que otras especies.	Grande y alargado. Pigmento malárico diseminado. Similar al de <i>P. m</i>	Como <i>P. vivax</i> pero más pequeño	Similar a <i>P. vivax</i> pero más pequeño y menos numeroso
<b>Ciclo eritrocítico</b>	Terciano (48h.)	Terciano (48h.)	Cotidiano (24h.)	Terciano (48h.)	Cuartano (72h.)
<b>Hipnozoitos</b>	NO	SI	NO	SI	NO
<b>Regiones y Prevalencia</b>	Tropicales y subtropicales. 50%	Tropicales, subtropicales y climas templados. Rara en África Centro-oeste. 40-45%	Sudeste Asiático. 0-8% en macacos	África occidental tropical. 5%.	Tropicales y subtropicales. 7%
<b>Periodo de incubación</b>	10 días	13-17 días	9-12 días	16-18 días	28-30 días
<b>Parasitemias</b>	Elevadas (hasta 20%)	Bajas (2%)	Elevadas	Bajas (2%)	Bajas

Tabla 2: Comparación de las principales características morfológicas para la diferenciación de especies de *Plasmodium*. Diego Torrús, Cristina Carranza, José Manuel Ramos, Juan Carlos Rodríguez, José Miguel Rubio, Mercedes Subirats, **Thuy-Huong Ta-Tang**. Enferm Infecc Microbiol Clin, jul 2015;33 suppl 2:40-46

El método tradicional de diagnóstico de las infecciones por filarias es la visualización de las microfilarias en piel o en sangre, y para muchos autores este método continúa siendo el método de referencia (Walther & Muller, 2003), a pesar de que nuevos métodos de diagnóstico han emergido como la PCR, detección de antígenos en gotas de sangre, ultrasonidos para visualizar adultos o pruebas de detección inmunológicas.

La presencia de los gusanos adultos es raramente discernible, por tanto el diagnóstico se basa principalmente en la detección de las larvas L1 (microfilarias) en sangre o biopsias cutáneas, teniendo siempre en cuenta que la presencia de microfilarias indica infección pero no el grado de severidad de la infección. La no visualización de microfilarias tampoco indica que el paciente no esté infectado, hay pacientes con claros síntomas y ser amicrofilarémicos.

El método de referencia para detectar microfilarias de *O. volvulus* es la microscopía del pellizco cutáneo, que a la vez nos permite determinar la intensidad de la infección. Es específico, aunque la visualización *in situ* puede provocar confusión con otras filarias cutáneas (Ta *et al.*, 2015. Pendiente de ser sometido), pero poco sensible, especialmente cuando la carga es baja. Dado que la Ivermectina tiene un efecto de aclaramiento de las microfilarias de la piel, disminuyendo más aún la sensibilidad de la técnica, este método no es muy adecuado en áreas donde se realiza la distribución masiva de Ivermectina en los programas de control de la oncocercosis en África y America.(Boati & Richards, 2006).

El diagnóstico parasitológico de las infecciones por filarias sanguíneas se realiza en extensiones de sangre capilar y posterior tinción con Giemsa o con hematoxilina para diferenciar las especies de filarias. Hay que señalar que en caso de microfilaremiás inferiores a 100 microfilarias/ml no es suficiente la extensión de sangre directa sino que debe de utilizarse preparados de sangre concentrada, el límite de detección está en 50 microfilarias/ml o una 1 microfilaria por extensión (Eberhard & Lammie, 1991; Nanduri & Kazura, 1989)

Otros métodos usados para la detección de microfilarias son las técnicas de concentración. La más conocida es la técnica de Knott (1939), ésta usa 1 ml de sangre venosa anticoagulada que es lisado y fijado con formalina 2% en agua, después de 12-24h o centrifugación, se visualiza el sedimento teñido con azul de metileno o Giemsa al microscopio. Un inconveniente del método es la precipitación de las proteínas debido a la formalina y la cantidad de sedimentos que se forma en la preparación.

Morfológicamente, las características más importantes para identificar las diferentes especies de filarias son: tamaño, forma y espacio en la parte terminal de la

cola, presencia o ausencia de vaina, disposición de los núcleos al final de la cola (Figura 7. Tabla 3). Sin embargo, todas estas características no son insuficientes para identificar a la especie de microfilaria (Ta *et al.*, 2015. Sometido y en estado de revisión).

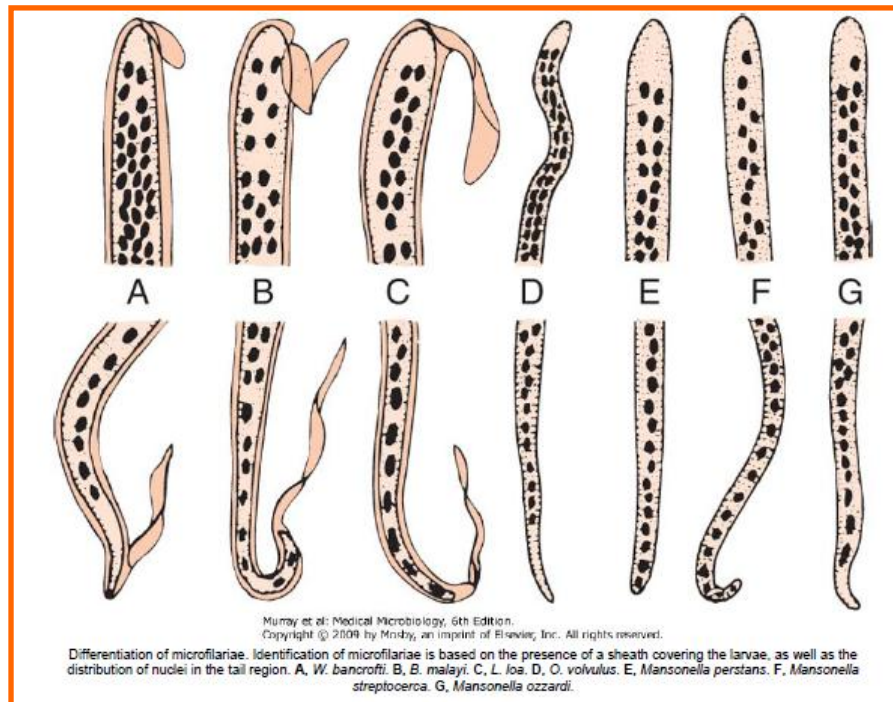


Figura 7: Diferenciación de las microfilarias. Se basan en la presencia o ausencia de vaina y la distribución de los núcleos en la región final. A: *W. bancrofti*; B: *B. malayi*; C: *L. loa*; D: *O. volvulus*; E: *M. perstans*; F: *M. streptocerca*; G: *M. ozzardi*. (Figura tomada de Murray et al., 2009)

En la Tabla 3 se comparan las distintas especies de filarias humanas, mostrando sus principales características morfológicas (microfilarias y adultos), vector, distribución geográfica, clínica y tratamiento.

	<i>O. volvulus</i>	<i>W. bancrofti</i>	<i>Brugia spp.</i>	<i>L. loa</i>	<i>Mansonella spp.</i>
<b>Cola de microfilaria</b>	Sin núcleos en la parte final de la cola; forma cónica a puntiaguda.	Los núcleos casi llegan al final de la cola; forma cónica a puntiaguda.	Cónico con una constricción. Un núcleo al final de la cola y otro núcleo antes de la constricción.	Cónico con núcleos hasta el final de la cola.	<i>M. perstans</i> : redondeado y con núcleos. <i>M. ozzardi</i> : larga, afilada y sin núcleos. <i>M. streptocerca</i> : forma de gancho.
<b>Vaina en microfilarias</b>	Ausente	Presente. No se tñe con Giemsa.	Presente. Giemsa: color rosa.	Presente. No se tñe con Giemsa.	Ausente.
<b>Microfilarias: Periodicidad y localización</b>	Sin periodicidad. Piel	Nocturna. Sangre	Nocturna. Sangre.	Diurno. Sangre.	Sin periodicidad. <i>M. perstans</i> y <i>M. ozzardi</i> : sangre <i>M. ozzardi</i> y <i>M. streptocerca</i> : piel.
<b>Microfilaria: largo x ancho</b>	304-315 x 5-9 µm	244-296 x 7,5-10 µm	177-230 x 5-7 µm	231-250 x 5-7 µm	<i>M. perstans</i> : 190-200 x 4-5 µm <i>M. ozzardi</i> : 163-203 x 3-5 µm <i>M. streptocerca</i> : 180-240 x 5-6 µm
<b>Adultos: Macho Hembra</b>	♂: 1,9-4,2 cm ♀: 33-50 cm	♂: 4 cm ♀: 8-10 cm	♂: 1,3-2,3cm ♀: 4,3-5,5 cm	♂: 2-3 cm ♀: 4-7 cm	♂ ♀ <i>M. perstans</i> : 4,5-6 cm 7-8 cm <i>M. ozzardi</i> : 2,4-2,8 cm 6,5-8,1 cm <i>M. streptocerca</i> : ? 2,7 cm
<b>Localización de adultos</b>	Nódulos fibrosos subcutáneos (oncocercomas)	Sistema linfático.	Sistema linfático.	Tejido conjuntivo subcutáneo.	Cavidad peritoneal o la cavidad pleural ( <i>M. perstans</i> y <i>M. ozzardi</i> ), o el tejido subcutáneo o el dérmico ( <i>M. streptocerca</i> ).
<b>Vector</b>	Hembras del género <i>Simulium</i> (hospedador intermedio).	Mosquitos hembra de <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> , <i>Culex</i> y <i>Mansonia</i> .	Mosquitos hembra de <i>Mansonia</i> y <i>Aedes</i> .	Moscas del género <i>Chrysops</i> .	<i>M. perstans</i> : <i>Culicoides</i> <i>M. ozzardi</i> : <i>Culicoides</i> , <i>Simulium</i> , <i>M. streptocerca</i> : <i>Culicoides</i> .
<b>Distribución geográfica</b>	África tropical y zonas de América Central, Méjico y zonas del norte de Sudamérica.	Cosmópita. Trópicos y subtrópicos.	Malasia, India, Tailandia, Vietnam, China, Corea, Japón y muchas islas del Pacífico.	África Central y Oeste.	<i>M. perstans</i> : África tropical, Centro y Sudamérica. <i>M. ozzardi</i> : América Central y Sur. <i>M. streptocerca</i> : África, por el Congo.
<b>Clínica</b>	Alteraciones cutáneas y oculares (ceguera de los ríos).	Elefantiasis filariásica.	Linfaedema y/o elefantiasis.	Loiasis. Edema de Calabar.	Asintomáticos o con signos inespecíficos.
<b>Tratamiento</b>	Extirpación quirúrgica del nódulo encapsulado. Ivermectina para las microfilarias.	DEC (dietilcarbamazina). Ivermectina, albendazol.	DEC (dietilcarbamazina).	DEC (dietilcarbamazina). Ivermectina, albendazol.	<i>M. perstans</i> : Albendazol o Mebendazol <i>M. ozzardi</i> : Ivermectina <i>M. streptocerca</i> : DEC

Tabla 3: Se comparan las distintas especies de filarias mostrando sus principales características para ayudar en la identificación de la especie infectante.

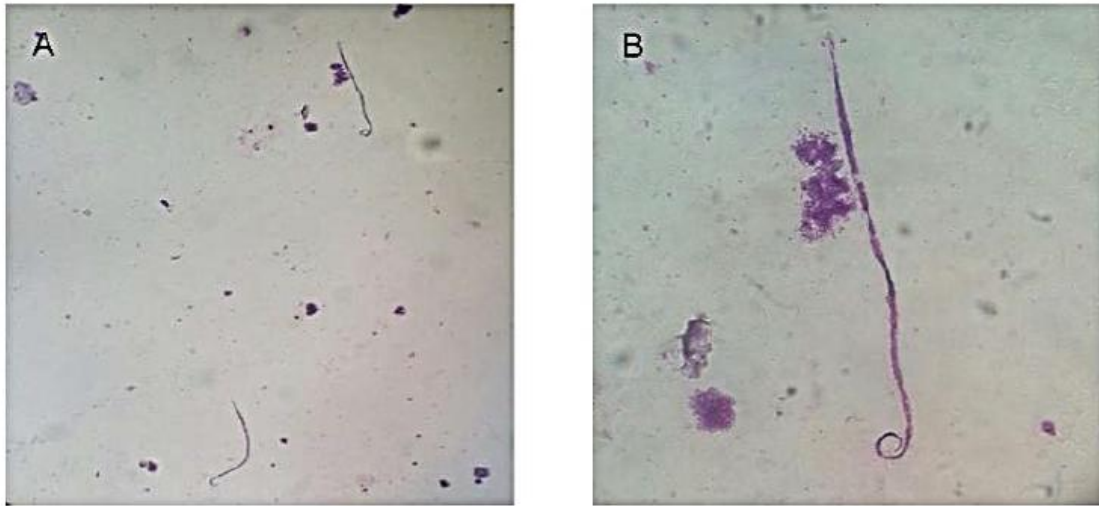


Figura 8: Microfilarias de *M. streptocerca* en un pellizco cutáneo de una paciente de Guinea Ecuatorial. Muestra donada por el Dr. Rogelio López-Vélez del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

#### 4.2.2.2 Detección de antígenos (Prueba de diagnóstico rápido)

A diferencia de la detección de anticuerpos, la determinación de antígenos del parásito circulante en suero, orina o heces puede constituir un marcador más adecuado de la presencia de una infección activa y puede indicar también la carga del parásito. De igual forma, la detección de antígenos específicos del parásito permite elaborar un diagnóstico definitivo del organismo etiológico.

Los métodos más frecuentes de detección de antígenos son: enzoinmunoanálisis, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis e inmunotransferencia. Diversos preparados comerciales para la detección de antígenos parasitarios se encuentran disponibles, cuya sensibilidad y la especificidad descritas son bastante buenas. Las ventajas de estas técnicas son el menor esfuerzo asociado y un posible aumento de la sensibilidad. Entre sus inconvenientes se encuentra la pérdida de experiencia en parasitología y que en algunos casos, la prueba disponible evalúa únicamente un organismo, mientras que el estudio microscópico convencional proporciona la oportunidad de reconocer numerosos parásitos diferentes.

Las pruebas inmunocromatográficas basados en la captura de antígeno mediante anticuerpos monoclonales frente antígenos específicos para la detección de *Plasmodium* en sangre se han desarrollado para poder hacer el diagnóstico rápido e in situ sin necesidad de tener un laboratorio o equipamiento complejo (Merwyn *et al.*, 2011). Son un valioso complemento a la microscopía para el diagnóstico de malaria. En realidad, las pruebas de diagnóstico rápido (RDT: Rapid Diagnostic Test) son útiles para identificar la infección por *P. falciparum*, pero no pueden ser usados para

identificar específicamente especies que no sean *P. falciparum* tales como *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*. La sensibilidad alcanza los 100 parásitos/μl para *P. falciparum* y algo superior para el resto de plasmodios humanos (Moody, 2002; Torrus *et al.*, 2015).

La mayoría de los RDT (Prueba de diagnóstico rápido) se han diseñado para reaccionar con antígenos o enzimas (abundantes en las formas asexuales y sexuales del parásito) presentes en los glóbulos rojos parasitados (Jelinek *et al.*, 2000). En el caso de *P. falciparum*, el antígeno hidrosoluble HRP-2 (proteína rica en histidina-II) es usado por expresarse únicamente en *P. falciparum*. Normalmente se usa otro anticuerpo monoclonal frente a un antígeno común a todos los plasmodios (antígeno Pan) como aldolasa o la lactato deshidrogenasa (pLDH), en este las pruebas que usan la pLDH como antígeno son más sensibles que los que usan la aldolasa para detectar especies no-falciparum (Khairnar *et al.*, 2009).

La capacidad de los RDT para detectar infecciones no-falciparum, especialmente en los casos de *P. ovale* y *P. malariae* varía del 0 al 50% (Rubio *et al.*, 2001). Estudios previos sugieren que el nivel de expresión de los antígenos pan-*Plasmodium* (LDH y aldolasa) en *P. ovale* y *P. malariae* puede ser mínimo y esto en combinación con una baja parasitemia en estas infecciones les hace indetectables por los RDTs (Runsewe-Abiodun *et al.*, 2012).

La mayor limitación de los RDTs es no poder identificar infecciones individuales de *P. falciparum* de las infecciones mixtas y no poder distinguir otras especies no-falciparum (Maltha *et al.*, 2010). Otras desventajas serían la baja sensibilidad en especial en infecciones por *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, la reacción cruzada con otros antígenos no maláricos y la persistencia de la reactividad después de tratamientos correctos (Rubio *et al.*, 2001). Pero a pesar de estas desventajas los RDTs se han hecho un hueco en el diagnóstico de la malaria y son especialmente recomendado por la OMS para sustituir el diagnóstico parasitológico en aquellos lugares donde no se pueda realizar. Además presentan numerosas ventajas como la no necesidad de personal altamente cualificado, son simples de realizar y fáciles de interpretar con una excelente concordancia entre diferentes usuarios, alta especificidad para casos de malaria por *P. falciparum* y son métodos rápidos que no necesitan equipos complejos asociados y se pueden realizar en zonas endémicas rurales alejado de laboratorios y centros de salud (Iqbal *et al.*, 1999; Gatti *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos los falsos negativos son debido a la baja parasitemia, pero en otros pocos casos son debido a una alta parasitemia, en estos casos se produce un efecto denominado prozona que hace que el monoclonal no sea capaz de capturar el antígeno por el exceso del mismo (Gillet *et al.*, 2011). En otros casos se ha visto que determinadas cepas de *P. falciparum* no expresan la proteína HRP-2 dando lugar a



falsos negativos. Ocasionalmente los falsos positivos son debido a la presencia de factor reumatoide (Bartoloni *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 2001).

Los test rápidos para la detección de filariosis se dirigen preferentemente a la detección de la filariosis linfática por *W. bancrofti*. El primer test antigénico basado en ELISA para filariosis se basó en el empleo de un anticuerpo monoclonal (Og4C3) que reconoce un antígeno que se expresa en la fase adulta sin reaccionar con *Brugia* spp. u *O. volvulus* (More & Copeman, 1990). La OMS recomienda en el programa mundial de eliminación de filariosis linfática un test rápido en forma de tarjeta comercializado por Binax que se basa en un anticuerpo monoclonal (AD12.1) frente un antígeno de secreción de 200 kDa (Weil *et al.*, 1997). Esta prueba rápida no presenta reacciones cruzadas frente a otros helmintos incluyendo otras filarias y presenta además las mismas ventajas de rapidez, no necesidad de equipamiento sofisticado, ni personal cualificado como los RDTs de malaria. Entre las desventajas están que hay que conservar las tarjetas en frío (2-8 °C), el coste es elevado y se ha comprobado que los antígenos persisten en individuos hasta 3 años después de tratamiento (Bhumiratana *et al.*, 1999; Adikaram *et al.*, 2006).

También se han desarrollado pruebas para la detección de antígenos de *Onchocerca*, pero no con buenos resultados (Mbacham *et al.*, 1992). Prepararon un anticuerpo monoclonal (Mov-1) específico para un antígeno cuticular de 20 kDa, que funcionó muy bien en muestras de orina pero no en el suero de pacientes. El uso de la detección de antígenos circulantes a través del examen de complejos inmunes fue otra alternativa utilizada pero no dio resultados satisfactorios en los diferentes desarrollos (Chandrashekar *et al.*, 1993; Thambiah *et al.*, 1992; Harnett *et al.* 1997). Más recientemente, Cho-Ngwa *et al.* (2005) han descrito tres monoclonales, capaces de detectar antígenos del adulto de *Onchocerca* con especificidad y sensibilidad de 50-70% respectivamente.

#### **4.2.2.3 Métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos**

El uso de pruebas basados en la amplificación de ácido nucleico tales como PCR y PCR de transcripción inversa, PCR a tiempo real y más recientemente sistemas basados en amplificación isotérmica (*LAMP: Loop mediated isothermal amplification*), ha incrementado considerablemente la sensibilidad analítica de los ensayos para muchos patógenos humanos, incluyendo la detección de los parásitos de la malaria.

Otra ventaja es que los resultados son independientes del estado inmunológico del paciente o de los antecedentes de una infección previa, por lo que son capaces de identificar la infección activa.

En el caso de la malaria diferentes trabajos han mostrado que la sensibilidad, en torno a 0,01 parásito/μl de sangre, es mayor que los métodos convencionales basados en microscopía (5-20 parásito/μl) o los métodos basados en detección de antígeno (100 parásitos/μl) (Torrús *et al.*, 2015). Por otro lado la especificidad también mejora permitiendo una mejor caracterización de especie y la detección de infecciones mixtas en mayor proporción que otros métodos.

En los últimos 20 años se han publicado más de 60 conjuntos de cebadores o *primers* diferentes para la detección de *Plasmodium* (Murphy *et al.*, 2013). La diana más utilizada para la discriminación de especies de plasmodios es la subunidad pequeña del ADN ribosómico (ssu-rRNA o 18S), por presentar zonas variables y conservadas a lo largo de la secuencia nucleotídica del gen (Rubio *et al.*, 2002), aunque otras dianas como el ADN mitocondrial también son utilizadas (Strom *et al.*, 2014).

El método más citado en la literatura es el de Snounou *et al* (1993) con las diferentes modificaciones que ha sufrido en el tiempo. Esta PCR, basada en la amplificación del gen que codifica la ssu-rRNA, consiste en una nested (PCR anidada) con un primer proceso de amplificación general para todos los plasmodios seguido de cuatro procesos de amplificación individuales para cada una de las especies que pueden infectar a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Posteriormente se incorporó un quinto proceso de amplificación específico para género (Singh *et al.*, 1999; Snounou & Singh, 2002) y más recientemente un sexto para *P. knowlesi* (Singh *et al.*, 2004).

A pesar de estar considerada como una técnica altamente sensible y específica para el diagnóstico de malaria (< 10 parásitos/μl), presenta inconvenientes ya que involucra de 5 a 6 reacciones de PCR separadas para detectar las cinco especies de *Plasmodium*, lo que requiere gran cantidad de reactivos y productos desechables, además de requerir elevada mano de obra y mayor riesgo de producir contaminaciones cruzadas. Además es importante que cualquier método de diagnóstico basado en amplificación genómica tenga controles internos de reacción, no confundiendo inhibiciones de la reacción con falsos negativos (Imwong *et al.*, 2009).

Como solución a estos inconvenientes se desarrolló la Nested múltiplex malaria PCR (Rubio *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002) y sus posteriores modificaciones (Ta *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2014). Esta PCR, que es utilizada habitualmente por laboratorios de referencia del diagnóstico de malaria de diferentes países incluida España, consiste en un doble proceso de amplificación que también usa como diana la subunidad pequeña del ARN ribosómico, que incorpora en la primera PCR un control interno de reacción y



en la segunda un grupo de cebadores específicos para cada una de las especies de plasmodio humanas de forma que estas son reconocidas por el tamaño diferencial del fragmento en geles de agarosa electroforesis de ácidos reduciendo el número de procesos de amplificación de seis a dos (Figura 1.9). Recientemente se ha modificado el método para incluir también la detección de *P. knowlesi* (Miguel-Oteo & Rubio, 2014).

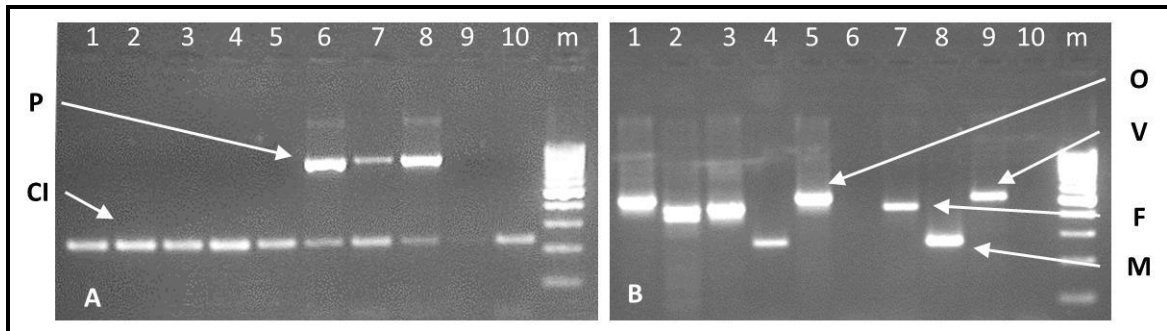


Figura 9: Semi-Nested Multiplex Malaria PCR. (A) 1° PCR. (B). 2° (Multiplex) PCR. CI: Control interno humano (223 pb) . P: *Plasmodium* sp. (783-821bp). V: *P. vivax*, F: *P. falciparum*, O: *P. ovale*, M: *P. malariae*, m: Marcador de 100bp.

Existen otras nested múltiplex PCR que identifican las cinco especies de malaria humana (Van Hong *et al.*, 2013). En general estas técnicas suelen ser complicadas de transferir a otros laboratorios, como ejemplo un sistema hexaplex PCR (Chew *et al.*, 2012) con un único proceso de amplificación capaz de caracterizar las cinco especies de plasmodios simultáneamente, así como infecciones mixtas diseñado por Chew *et al.*, (2012) y con el que consiguieron un elevado grado de especificidad, detectando hasta 0.25 parásitos/ $\mu$ L pero con el inconveniente que nadie ha podido reproducir sus resultados. Por el contrario, la Nested multiplex malaria PCR esta comercializada en formato gel *ready to use* mostrando una elevada sensibilidad y especificidad (Iglesias *et al.*, 2014). También se han desarrollado métodos para la identificación de las nuevas subespecies descritas *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri* (Rojo-Marcos *et al.*, 2014).

En los últimos años los nuevos métodos que se diseñan están basados en PCR a tiempo real. Estos métodos teóricamente presentan ventajas sobre los métodos de PCR convencional, por ejemplo, se disminuye el tiempo de respuesta al ser un único proceso de amplificación, no es necesario un análisis post-amplificación en geles de agarosa, se disminuye la posibilidad de contaminación y es posible la cuantificación de la carga parasitaria. Aunque estos métodos según sus autores se caracterizan por una alta sensibilidad (1-2 parásitos/ $\mu$ L) en general están por debajo de los métodos

más utilizados basados en PCR convencional, incluso en algunos casos no mejorando la sensibilidad de la microscopía (Bastien *et al.*, 2008).

Los métodos de PCR a tiempo real pueden estar basados en la detección mediante sondas, fluoróforos intercalantes (SYBR Green, EVA Green) o combinando ambos métodos. Los métodos basados en SYBR Green son los más abundantes pero carecen de especificidad, salvo aquellos que son capaces de identificar correctamente el fragmento amplificado por la curva de desnaturalización, en este caso hay procesos que pueden distinguir entre las diferentes especies de *Plasmodium* humanos (Tajebe *et al.*, 2014). Los métodos basados en sondas son los más específicos.

Divis *et al.* (2010) diseñaron un ensayo con sondas TaqMan para caracterizar las cinco especies de *Plasmodium* que afectan al hombre, usando un conjunto de cebadores, identificando así a cada especie de forma individual por la presencia de sondas de hidrólisis especie-específicas (Divis *et al.*, 2010). Sin embargo, las infecciones mixtas, eran identificadas con señales bajas o se perdían debido a la competencia de los cebadores por el ADN de la especie más abundante. Una aproximación diferente fue realizada por Reller *et al.* (2013) que diseñaron una Múltiplex cuantitativa PCR que emplea cebadores y sondas para las cinco especies de *Plasmodium* humanas, dirigidas no solo a un solo gen sino a varios en cada una de las especies (Reller *et al.*, 2013). Algunos de estos métodos se presentan liofilizados (Kamau *et al.*, 2014) o en formato comercial (Genesig, Altona Diagnostic, Artus, etc.), lo que hace más fácil la transferencia entre laboratorios y las inter-comparaciones.

Por último existen métodos que mezclan sondas específicas con fluoróforos intercalantes, métodos que se les puede considerar diagnósticos y confirmatorios ya que a la especificidad de la sondas se les añade la confirmación de especie por la temperatura de desnaturalización de los fragmentos amplificados (Figura 10) (Ta *et al.*, 2010).

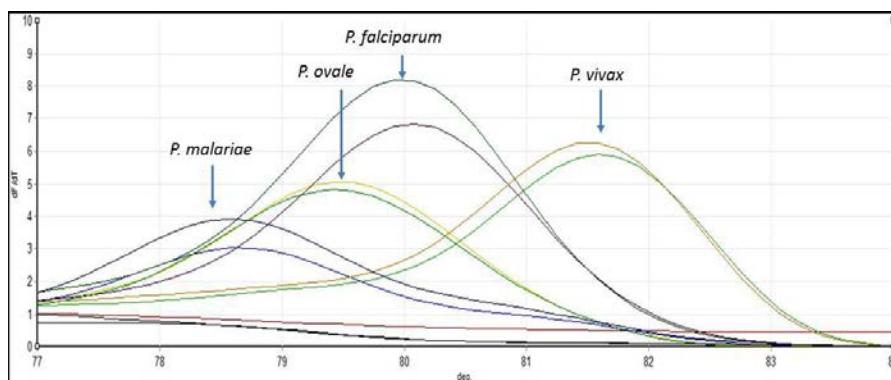


Figura 10. Real Time-Malaria- PCR. Curva de desnaturalización.

Recientemente se están desarrollando métodos de diagnóstico basados en nuevas tecnologías como LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) y NASDA (*nucleic acid sequence-based amplification*). El LAMP, un proceso de amplificación isotérmico, según sus partidarios tiene ventajas con respecto a la PCR convencional, rapidez, mayor sensibilidad y la no necesidad de costosos equipos de amplificación genómica lo cual es muy útil para su utilización en zonas remotas o de bajos recursos. Por el contrario, sus detractores dicen que su diseño es muy complicado (utiliza de 4-6 primers que reconoce de 6-8 regiones diferentes de la misma diana del ADN, eliminando las uniones no específicas), que la tecnología está bajo patente (aunque esta acaba en 2016), que no es un sistema de identificación múltiple, por lo que no detectaría las diferentes especies de *Plasmodium* sino solo aquella hacia la que estuviera dirigida el ensayo, y la línea entre positividad y negatividad puede ser muy subjetiva (Figura 11).

Es un nuevo método de amplificación de ácidos nucleicos que fue originalmente desarrollado por Notomi *et al.*, 2000. Es un método fácil y rápido. En menos de una hora es capaz de amplificar en condiciones isotérmicas  $10^9$  copias de la diana elegida (Lau *et al.*, 2011). Sólo es necesario un incubador, como un baño María o un termobloque, para la amplificación del ADN. Por todo esto le convierte en un método factible de aplicación en campo.

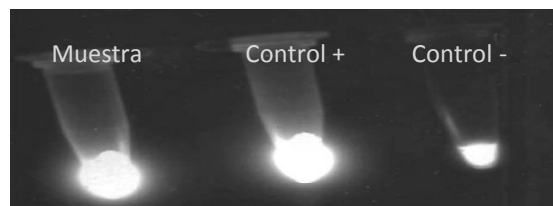


Figura 11. LAMP visualización con SYBR green bajo luz ultravioleta. Obsérvese la presencia de fluorescencia en el control negativo de la reacción.

Hay numerosos ensayos publicados en los dos últimos años basados en esta tecnología, incluyendo específicos para *P. vivax* (Vallejo *et al.*, 2015), para *P. falciparum* (Mohon *et al.*, 2014) o para *P. knowlesi* que utiliza como diana el gen AMA-1 mediante un conjunto de seis primers (Lau *et al.*, 2011). Estos ensayos, según sus autores, son capaces de detectar bajos niveles de parasitemia y son de 10-100 veces

más sensibles que las nested-PCRs pero trabajos de comparación entre ambos tipos de métodos muestran sensibilidades muy similares (Marti *et al.*, 2015).

Fuera de esta revisión quedan métodos para la detección de genotipos y genes asociados a resistencia (Picot *et al.*, 2009) en *P. alciparum* o *P. vivax* y también métodos basados en NASDA (nucleic acid sequence-based amplification) que en *P. falciparum* se han desarrollado especialmente para detectar la presencia de gametocitos por medio de la detección de genes específicos que se expresan solo en esos estadios (Schneider *et al.*, 2004).

Los métodos de amplificación genómica también se desarrollaron para la mayoría de las especies de filarias. Tienen ventajas respecto al diagnóstico parasitológico en sensibilidad y respecto a los métodos inmunológicos en especificidad. Los métodos moleculares pueden ser aplicados tanto en el ser humano como en el vector, y también pueden desarrollarse métodos que nos permita detectar resistencias a ciertos medicamentos.

Para el diagnóstico de *O. volvulus*, el método recomendado y más utilizado es la PCR que amplifica la secuencia repetida O-150 para la detección de microfilarias en piel (Toe *et al.*, 1998; Maia-Herzog *et al.*, 1999) y que se utiliza también en los insectos vectores (simúlidos). Es la técnica usada en los últimos 20 años para conocer la carga de microfilarias en una comunidad después del tratamiento con ivermectina. Una limitación de la técnica es reacción cruzada que produce con *O. ochengi*, parásito que infecta al ganado en África sub-sahariana. Para solventarlo, se diseñó una sonda de ADN específica de *O. volvulus* y aumentar así la especificidad.

La diana más usada para detectar *Brugia* en humanos y vectores es la amplificación de la secuencia de ADN repetida en tándem *Hha* I (McReynolds *et al.*, 1986). Recientemente, otros autores han desarrollado una PCR en tiempo real usando la misma diana y ha demostrado ser más sensible para detectar pacientes en periodo pre-patente y amicrofilarémicos (Albers *et al.*, 2014) usando como muestra sangre diurno. Otras dianas usadas son la colágeno transcriptasa de la larva L3 (Laney *et al.*, 2008), el ITS-1 (Nuchprayoon *et al.*, 2005), la glutatión peroxidasa (Thanomsub *et al.*, 2000) y el intrón 3 de *alt-2* (Sakthidevi *et al.*, 2010).

Para *W. bancrofti* se han usado como dianas secuencias repetidas y espaciadores del ADN ribosomal (Zhong *et al.*, 1996; Abbasi *et al.*, 1999; Nuchprayoon *et al.*, 2005), pero nunca se han hecho estudios comparativos entre estas técnicas y determinar cuál es el mejor biomarcador.

Igualmente para *L. loa* se han desarrollado muchas PCRs usando diferentes dianas (Klion *et al.*, 1991; Toure *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 2011).

Para diferenciar *O. volvulus* de la otra microfilaria dérmica en África *M. streptocerca*, Fischer *et al* (1998) creó una nested PCR cuya diana era el 5S ADNr, y para diferenciarlo de *M. ozzardi* en Latino-América, está la PCR de Morales-Hojas *et al.* (2001).

Aunque cada una de estas PCRs por separado tienen una alta sensibilidad y especificidad, el problema que tienen es que son individuales y para realizar un diagnóstico de filariasis necesitaríamos realizar cuatro PCRs en sangre y dos PCRs en piel. El único método que es universal para todas las filarias es la de Nuchprayoon *et al.*, (2005) pero por nuestra experiencia sabemos que esta Nested PCR-RFLP (digestión con Ase I) es laboriosa y no siempre se consigue amplificación porque el fragmento que se quiere amplificar en la 1ª PCR abarca 18S (parcial)-ITS1-5,8S-ITS2-28S (parcial) y es un fragmento demasiado grande para amplificar.

El método desarrollado en el Laboratorio de Malaria & otras Parasitosis Emergentes para el diagnóstico de filarias es una Nested PCR que amplifica la región ITS-1 del ADNr y que diferencia a las distintas especies de filarias por tamaño del amplicón (Tang *et al.*, 2010). Esta Nested PCR se puede aplicar a muestras de cualquier índole (sangre, piel u otros tipos líquidos orgánicos) y detecta simultáneamente cualquier especie de filaria presente en la muestra mostrando alta sensibilidad y especificidad. Alternativamente, los amplicones pueden ser digeridos por la *Taq* I para una mejor diferenciación de tamaño de los fragmentos en geles de agarosa. La 2ª PCR de este método se ha adaptado a las condiciones de una PCR en tiempo real y los resultados obtenidos es que la PCR cuantitativa es ligeramente menos sensible que la Nested PCR pero el ahorro en tiempo de ejecución y proceso, y una menor contaminación hace que sea un método más atractivo y posiblemente sea la PCR en tiempo real el nuevo sustituto.

Las técnicas de “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD), PCR y variantes, y más recientemente la PCR a tiempo real y “Loop-mediated isothermal amplification” (LAMP) (Notomi *et al.*, 2015), son técnicas que han mostrado buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de filariosis humana. Como kit comercial usando la técnica de LAMP sólo existe para malaria (Polley *et al.*, 2013), giardiasis (Plutzer & Karanis, 2009) y leishmaniasis (Karani *et al.*, 2014), y en un futuro próximo también para el diagnóstico y control de la filariasis.

La técnica de LAMP, es muy útil en laboratorios con poca infraestructura o para realizar estudios epidemiológicos y de campo en países endémicos pero tiene el inconveniente de mostrar menor sensibilidad frente a otras técnicas moleculares. La técnica de RAPD se ha empleado para analizar variaciones genéticas interespecíficas e intraespecíficas y relaciones filogenéticas en *W. bancrofti* (Nuchprayoon *et al.*, 2007).

## 5. Aplicaciones y utilidad de los Sistemas de Análisis Múltiple (SAM)

Es irrefutable que se necesitan herramientas de diagnóstico altamente sensibles y estrictamente específicas para la detección de cualquier parásito, sea un plasmodio, una filaria o cualquier otro y que a día de hoy los métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos (ADN o ARN) son los más adecuados para garantizar el éxito tanto para realizar un diagnóstico como certificar la interrupción de la transmisión de la infección apoyando los programas de control. Si además la metodología es capaz de proporcionar un ahorro en cuanto a coste (personal, reactivos) y tiempo, sería un sistema de diagnóstico rozando la idealidad.

Se entiende como Sistemas de Análisis Múltiple (SAM) aquellos que permiten de manera simultánea la detección de varias especies de parásitos en un único proceso. Estos SAM tienen que mantener las características de alta sensibilidad y estricta especificidad que los métodos que detectan de forma individual el parásito. A su vez tienen que ser aplicables tanto en el ser humano como en el vector, y a todo tipo de muestras clínicas sea cual sea la procedencia (sangre, suero, plasma, orina, esputo, saliva, piel, líquido cefalorraquídeo o cualquier otro tipo de muestra).

Técnica	Ventajas	Desventajas
Parasitológico	Bajo coste, ideal para entornos con recursos escasos	Personal muy cualificado, no detecta infección pre-patente y amicrofilarémicos, largo tiempo para su preparación, tedioso, laborioso, poca sensibilidad
Inmunológico	Ideal para cribado a gran escala y con alto rendimiento, disponible en formatos de tests rápidos	No distingue infecciones actuales o pasadas, limitada especificidad
PCRs	Alta sensibilidad y especificidad, ideal para cribado a gran escala, diagnóstico múltiple, detecta resistencias a fármacos	Personal cualificado, equipos y reactivos costosos, sensible a inhibidores presentes en muestras o en vectores, requiere aislamiento de ADN
LAMP	No requiere de equipos costosos, reacción en un solo paso a la misma temperatura, no es sensible a inhibidores de la muestra, lectura visual, diagnóstico múltiple, semi-cuantitativo, ADN semi-purificado	Muestras fácilmente contaminables, requiere aislamiento de ADN, diseño complicado de cebadores y sondas, a veces se requiere más de una polimerasa

Tabla 4: actuales métodos para el diagnóstico de malaria y filaria con sus principales ventajas y desventajas.

Los métodos de referencia para el diagnóstico parasitológico se basan en la observación microscópica, pero la microscopía es muy subjetiva y requiere de una elevada experiencia, aparte de que no detecta las infecciones pre-patentes o las de baja carga parasitaria, dando lugar a falsos negativos y creando portadores capaces

de infectar a los vectores competentes y mantener la transmisión (Matisz *et al.*, 2011; Monge-Maillo *et al.*, 2015). A pesar de las limitaciones de la microscopía continúa siendo el método más popular gracias a su bajo coste y su idoneidad para laboratorios con recursos limitados.

La aparición de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, en los años 80, revolucionó el diagnóstico de las infecciones parasitarias, con métodos de mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía y la serología y con la capacidad de utilizarlos tanto en humanos como en los vectores. Pero posiblemente la mayor ventaja es que con un diseño adecuado estos métodos pueden detectar y caracterizar múltiples dianas (especies, géneros, familias), disminuyendo el tiempo de diagnóstico y simplificando los procesos actuales.

Son muchas las tecnologías que usan los ácidos nucleicos como biomarcadores de la infección: PCRs (PCR convencional, Nested PCR, Semi-Nested PCR, PCR en tiempo real), LAMP (loop-mediated isothermal amplification), RCA (rolling circle amplification), SDA (strand-displacement amplification), HDA (helicase-dependent amplification), RPA (recombinase polymerase amplification), INADisothermal nucleic acid detection assay, NEAR (nicking enzyme amplification) y EXPAR (exponential amplification reaction) (Buchan & Ledebøer, 2014; Alhassan *et al.*, 2015; Li & Macdonald, 2015).

Los métodos de diagnósticos basados en PCRs aunque resultan muy ventajosos, tienen también sus inconvenientes. El personal tiene que estar entrenado en el manejo de la técnica de PCRs, los equipos y reactivos son relativamente costosos, para dar un diagnóstico final se requiere de varias horas que van desde el aislamiento del material genético hasta la visualización del producto de PCR (~3-5 horas). Por estos motivos la PCR no se ha extendido en su implementación, en especial, en las zonas donde los recursos son más escasos.

El método de amplificación isotérmico más relevante y en primera línea por el momento es el LAMP (Notomi *et al.*, 2000), que parece ser el sustituto de las PCRs por su simplicidad y bajo coste. Amplifica el ácido nucleico en un solo paso (hasta  $10^9$  copias partiendo de muy pocas copias en sólo 1h) y todo el proceso se desarrolla a la misma temperatura (termobloque o baño de agua). El resultado de la amplificación es por detección visual (precipitación con pirofosfato de magnesio, cambio de color por indicadores sensibles a metal o por colorantes sensibles a cambios en el pH) (Tanner *et al.*, 2014; Notomi *et al.*, 2015). No necesita de equipos altamente costosos para realizar la amplificación ni necesita equipos post-amplificación, de ahí que esté siendo más usado en países de bajos recursos que las PCRs pero tiene el inconveniente que es un método de detección binario, es decir solo puede dar positivo o negativo.

En la presente tesis se eligió diseñar una PCR en tiempo real (Malaria RT-PCR) y una Nested-PCR (Nested-Filaria PCR) como SAM para la detección de varias especies de plasmodios (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* y *P. malariae*) y varias especies de filarias (*O. volvulus*, *W. bancrofti*, *Brugia spp.*, *L. loa* y *Mansonella spp.*) respectivamente en muestras de cualquier índole como indicador que los SAM son comparativamente superiores a los métodos de detección individual sin perder sensibilidad y especificidad.



## II. OBJETIVOS

"

## II. OBJETIVOS

### Objetivo general:

"

Diseñar, optimizar y/o validar sistemas de amplificación genómica múltiple, basados en PCR convencional y PCR cuantitativa, integrando en procesos simples la detección y caracterización de las cinco especies de *Plasmodium* que producen malaria en humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*) y de las filariosis humanas (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. timori*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca*) para seleccionar de aquellos sistemas diseñados el de mejor sensibilidad y especificidad para cada patología con una mejora en tiempo y recursos (personales y materiales) frente a los métodos de diagnóstico más utilizados actualmente.

### Objetivos específicos

"

Para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño, optimización y validación sobre el terreno de un método de diagnóstico de amplificación genómica por PCR a tiempo real para la identificación y caracterización de los diferentes plasmodios que afectan a humanos.
2. Diseño, optimización y validación sobre el terreno de un método de diagnóstico de amplificación genómica por Nested PCR para la identificación y caracterización de las diferentes filariosis humanas
3. Diseño, optimización y validación sobre el terreno de un método de diagnóstico de amplificación genómica por PCR a tiempo real para la identificación y caracterización de las diferentes filariosis humanas.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

"

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Material

"

##### 1.1. Muestras clínicas

"

Las muestras utilizadas en estos trabajos pertenecen a la colección de muestras y ADN del Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes (MAPELab) del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Registro Nacional de Biobancos C.0001392) e incluyen muestras parasitadas con *Plasmodium sp.* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), *Mansonella perstans*, *Loa loa* y *Onchocerca volvulus* además de muestras con otras patologías y otras no infectadas. Dentro de la colección se incluyen:

i) Muestras de pacientes con sospecha de infección por malaria o por filarias remitidas desde Hospitales y Centros de Atención Primaria del Sistema Nacional de Salud al MAPELAB para su correspondiente diagnóstico. Número de muestras: 500 sangres, 10 pellizcos cutáneos.

ii) Muestras de pacientes y monos con sospecha de malaria procedentes del Departamento de Parasitología del Instituto de Investigación Médica de Kuala Lumpur, Malasia (Medical Research Center, MRC). Número de muestras: 100 sangres.

iii) Muestras de sangre total y pellizcos cutáneos procedentes de voluntarios de Guinea Ecuatorial obtenidas en colaboración con el programa de control de la onchocerciasis en Guinea Ecuatorial. Proyecto aprobado por el Comité de ética del ISCIII (CEI PI 21\_2014) y el Ministerio de Salud de Guinea Ecuatorial. Número de muestras: 543 sangres y 543 pellizcos cutáneos.

iv) Muestras de sangre, pellizcos cutáneos y nódulos subcutáneos (oncocercoma) procedentes de estudios colaborativos con el Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia y de la Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM, Manaus, AM, Brasil. Proyecto aprobado por el Comité de ética de la Fundación de hematología y hemoterapia de Amazonas, Brasil con número (CAAE-0001/2006). Número de muestras: 460 sangres, 40 pellizcos cutáneos y 2 oncocercomas,

## 2. Métodos

### 2.1 Diagnóstico Microscópico

#### 2.1.1 Malaria

##### a) Gota gruesa (GG):

- Colocar una gota de sangre de unos 25-50  $\mu\text{l}$  en un portaobjetos limpio.
- Usando la esquina de otro portaobjetos, extender la gota (superficie de 1  $\text{cm}^2$ ) siguiendo movimientos circulares.
- No fijar con metanol o calor, dejar secar en un lugar protegido del polvo y de los insectos.
- Se tiñe con Giemsa al 3% (97 ml de agua destilada + 3 ml de Giemsa puro), 30 minutos.
- Se lava con un hilo fino de agua del grifo, o si es posible con agua destilada pH=7,2, con cuidado de que no se desprenda la muestra.
- Se deja secar al aire.
- Se observa al microscopio con objetivo 100x con aceite de inmersión.

Cálculo de la parasitemia en gota gruesa:

+ 1-10 parásitos por 100 campos de GG

++ 11-100 parásitos por 100 campos de GG

+++ 1-10 parásitos por 1 campo de GG

++++ >10 parásitos por campo de GG

##### b) Extensión fina (frotis):

- Colocar una gota de sangre (5-10  $\mu\text{l}$ ) en el lado esmerilado del portaobjetos.
- Colocar otro portaobjetos formando un ángulo de 30-40° y dejar que la gota de sangre se distribuya a lo largo de la línea de contacto de los dos portaobjetos.
- Rápidamente deslizar el portaobjeto que hace ángulo hacia el extremo contrario del portaobjetos.
- Fijar la preparación con metanol (5 min.) y dejar secar al aire. Eliminar las gotas residuales de metanol agitando el portaobjetos.
- Teñir con Giemsa al 10% (90 ml de agua destilada + 10 ml de Giemsa puro) durante mínimo 10 min.
- Se lava con un hilo fino de agua del grifo, o si es posible con agua destilada. pH=7,2, con cuidado de que no se desprenda la muestra.

"

- Se deja secar al aire.
- Se observa al microscopio con objetivo 100x con aceite de inmersión.

Para calcular la parasitemia en frotis se puede hacer de dos formas, porcentaje de glóbulos rojos infectados o número de parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre. En el primer caso se observan 25-50 campos, se cuentan los eritrocitos parasitados y los no parasitados y se estima la parasitemia en porcentaje. En el segundo se cuenta el número de parásitos y el número de glóbulos blancos en los 50-100 campos que se observan, estimándose que en un microlitro de sangre se corresponde a 8000 glóbulos blancos se calcula la cantidad de parásitos que hay por microlitro de sangre. Si se ha realizado el conteo celular del paciente se usa el dato real de glóbulos blancos y no el estimado.

$$\text{Número de parásitos} \times 8000 / \text{número de leucocitos} = \text{Parásitos}/\mu\text{l}$$

La conversión estimada entre ambas medidas, asumiendo que 1  $\mu\text{l}$  de sangre contiene  $5 \times 10^6$  glóbulos rojos, sería que 1% de parasitemia (1 glóbulo rojo parasitado por cada 100 glóbulos rojos) corresponde a 50.000 parásitos/ $\mu\text{l}$ .

### 2.1.2 Filarias

#### a) Técnica de concentración de Knott

- Mezclar bien 1 ml de sangre fresca o anticoagulada con EDTA, heparina o citrato sódico en un tubo con 9 ml de formol al 2% (lisa los hematíes y mata las microfilarias).
- Centrifugar 5 min. a 1000-2000 rpm.
- Decantar.
- Observar al microscopio el sedimento con objetivo 10x o 40x.
- Para identificar las microfilarias a nivel de especie, se hacen extensiones con el sedimento y se tiñen con Giemsa (no tiñe la vaina, sólo de *B. malayi*) o con Hematoxilina de Delafield (tiñe la vaina)

La microfilaremia se informa por el número aproximado de microfilarias observadas por ml de sangre.

**b) Microfilarias en piel (“pellizcos cutáneos”, “skin snips”):**

- Con la ayuda de una aguja se levanta la piel (sólo epidermis o papilas dérmicas, biopsias dermoepidérmicas exangües) y con la ayuda de un bisturí se corta una porción.
- La muestra se coloca en un portaobjetos con suero fisiológico.
- Se deja entre 30 minutos-4 horas.
- Las microfilarias irán emergiendo. Se observa su movimiento al microscopio con objetivo 10x o 40x.
- La identificación de especie se realiza por tinción con Giemsa o con Hematoxilina de Delafield.

**2.2 Métodos de Diagnóstico Molecular****2.2.1 Métodos de extracción de ácidos nucleicos (ADN)****2.2.1.1 Método de Chelex**

El método de Chelex utilizado fue el de Walsh *et al.* (1991) con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (Rubio *et al.*, 1999). Este método se puede usar en el aislamiento de ADN a partir de sangre completa pero es especialmente recomendable para la extracción a partir de manchas de sangre en papel o sangre coagulada. El Chelex es una resina química que tiene afinidad por unirse a proteínas y cationes como el hierro, principal inhibidor sanguíneo de la PCR, que al centrifugar precipita quedando el ADN sin inhibidores en el sobrenadante.

El método consiste en añadir 3 µl, 10 µl o 20 µl de sangre completa o manchas de sangre en círculos de 5 mm de diámetro a 1 ml de agua estéril. Se incuba la sangre 30 minutos a temperatura ambiente, agitando los tubos de vez en cuando. Se centrifugan 3 minutos a 14.000 r.p.m y se decanta el sobrenadante dejando unos 50 µl. Se añade 150 µl de Chelex-100 (BioRad®) al 5% y se incuba a 56°C durante 30 minutos. Se agitan los tubos en vórtex 10 segundos. A continuación se llevan los tubos a un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Se mezcla de nuevo en vórtex 10 segundos y se centrifugan 3 minutos a 14.000 rpm. Para los métodos de amplificación se usan 20-40 µl del sobrenadante, aunque volúmenes menores son aptos. El resto de ADN aislado se puede conservar a 4°C o a temperatura ambiente, pero antes de su utilización hay que centrifugar 3 minutos a máxima velocidad antes de su utilización. (Walsh *et al.*, 1991; Rubio *et al.*, 1999).

### 2.2.1.2 Método de purificación por columnas.

El método de *QIAgen*® es un método comercial que se puede usar en sangre completa u otros líquidos orgánicos, así como en tejidos y órganos. El kit utilizado para la extracción de ADN se denomina *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit*. Este método se basa en las propiedades de las resinas de sílice, que se unen diferencialmente a ácidos nucleicos dependientes de pH.

La extracción se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. Se deposita 20 µl de proteasa *QIAgen* (o proteinasa K) en el fondo de un tubo de eppendorf de 1,5 ml. Se añaden 200 µl de muestra de sangre (si se dispone de un volumen inferior se completa con PBS 1x hasta 200 µl). Se mezcla bien y después se añade 200 µl de buffer AL (buffer de lisis). Se agita en vórtex 15 segundos y se incuba a 56°C 10 minutos (tiempos mayores no aumenta ni la cantidad ni la calidad de ADN). Después de la incubación se da un pulso en la centrífuga. Se añade 200 µl de etanol puro (96-100%), se agita en vórtex 15 segundos y se da otro pulso en la centrífuga para bajar todos los componentes al fondo del tubo. Se pasa la solución a la columna de extracción colocándose sobre un tubo colector de 2 ml. Se centrifuga a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto y se elimina el filtrado quedando el ADN unido a la resina en la columna. Se coloca la columna en un nuevo tubo colector y se realizan dos lavados: el primero con la solución AW1 y centrifugándolo a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto, y el segundo con la solución AW2 y centrifugando posteriormente a 13.000 r.p.m. 3 minutos. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y se añade 200 µl (el mismo volumen de muestra del que se parte) de agua destilada estéril, se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto recuperándose el ADN en el tubo eppendorf. El ADN se puede usar al momento o conservarlo a 4°C hasta su uso. Para los procesos de amplificación se usan 5 µl aunque otros volúmenes pueden dar también buenos resultados, 1 y 10 µl.

En el caso de que la muestra sea un tejido u órgano se utiliza para la extracción de ADN un kit especial para muestras de tejidos, *QIAamp*® *DNA Mini Kit*. Previo al aislamiento se debe fragmentar o triturar con un homogenizador la muestra (máximo 25 mg o 10 mg en el caso de que sea tejido de bazo) junto con 80 µl de solución salina o PBS 1x. Se añade 100 µl de buffer ATL contenido en el kit y posteriormente 20 µl de proteinasa K. Se mezcla bien con vórtex y se incuba a 56°C hasta que la muestra esté totalmente lisada (dependiendo del tipo de muestra el tiempo puede variar desde 1 a 3 horas). Es conveniente agitar el tubo repetidamente durante la incubación si no se dispone de baño con agitador. También es posible



realizar incubaciones largas, por ejemplo toda la noche. Finalizada la incubación se debe realizar un pulso en la centrifuga. Se añaden 200 µl de buffer AL y se incuba a 70°C 10 minutos. A partir de aquí el protocolo sigue los mismos pasos que el aislamiento a partir de sangre.

El protocolo para la extracción de sangre se puede automatizar utilizando un robot (QIACube™, QIAgen™).

## 2.2.2 Nested-Multiplex Malaria PCR

El método usado es una variante de la Semi-Nested Multiplex Malaria PCR (Sn-M Malaria PCR) desarrollado por Rubio *et al.* (2002), el cual consiste en dos procesos de PCR múltiple (con más de dos cebadores por reacción) consecutivos o encadenados (anidada). Este método permite identificar las cuatro especies humanas por el tamaño del fragmento amplificado característico de cada uno de ellas. La diana seleccionada para el desarrollo de este método es el gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña (18S) del ribosoma (ssrDNA) e incluye un control interno de amplificación para evitar falsos negativos (18S rARN humano). El método es capaz de detectar entre 1 a 4 parásitos/µl de sangre que se corresponde con parasitemias del 0,0001%.

Las condiciones de amplificación fueron para la primera PCR: un paso inicial de desnaturalización de 7 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, terminando con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para la segunda PCR se usaron 2 µl de ADN amplificado en la 1ª PCR y las condiciones de amplificación fueron un paso inicial de 5 minutos a 94°C de desnaturalización seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 53°C y 30 segundos a 72°C finalizando con un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la primera y segunda reacción de la Nested Malaria PCR.

O g l e n ' f g ' t g c e e k » p "			
3BRET*82a'E'Z'62'elenqu+		4BRET*75'a'E'Z'57'elenqu+	
Ego r qpgpg"	Ecpwf cf 'r qt'wdq"	Ego r qpgpg"	Ecpwf cf 'r qt'wdq"
Dwhgt'eqp'O i En "	3z "	Dwhgt'eqp'O i En "	3z "
f P VRu"	2.4'o O "	f P VRu"	2.4'o O "
RNH"	2.3"ÜO "	P gy RNHj qt "	2.37"ÜO "
TGX"	2.3"ÜO "	O cnj qt v'	2.32"ÜO "
J WH"	2.2347"ÜO "	Hcnj qt v'	2.37"ÜO "
"	"	Qxcuj qt v'	2.32"ÜO "
"	"	Xkxuj qt v'	2.32"ÜO "
Vj 'r rko gtcuc"	3047"W"	Vj 'r rko gtcuc"	209"W"
CF P 'ckurf q"	7"Ün'	CF P 'f g'3aRET"	4"Ün'
Xqmo gp'hpcn'	72"Ün'	Xqmo gp'hpcn'	47"Ün'

Las condiciones de la mezcla de reacción se indican en la tabla 1 mientras que en la tabla 2 se presentan las secuencias de los diferentes cebadores o primers.

Tabla 2. Secuencia, concentración final de uso, temperatura de alineamiento de los cebadores y tamaño del fragmento esperado para la primera y segunda reacción de la Nested Malaria PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	[ $\mu$ M]	Reacción	Tamaño (pb)	(°C)	Especificidad
PLF	AGTGTGTATCAATCGAGTTTC	0,1	1° PCR	783-821*	55,7	Plasmodios
REV	GACGGTATCTGATCGTCTTC	0,1	1° PCR		58,7	Universal
HUF	GAGCCGCCTGGATACCGC	0,0125	1° PCR	231	70,3	Humano
NewPLFshort	CTATCAGCTTTTGATGTTAG	0,15	2° PCR		51,6	Plasmodios
Malshort	TCCAATTGCCTTCTG	0,10	2° PCR	241	53,0	<i>P. malariae</i>
Falshort	GTTCCCCTAGAATAGTTACA	0,15	2° PCR	370	52,3	<i>P. falciparum</i>
Ovashort	AGGAATGCAAAGARCAG	0,10	2° PCR	407	53,2	<i>P. ovale</i>
Vivshort	AAGGACTTCCAAGCC	0,10	2° PCR	476	52,7	<i>P. vivax</i>

\*Sólo visible en gel en casos de parasitemia alta, superiores al 3%. Tamaño del fragmento por especies: *P. malariae* 821 pb, *P. falciparum* 787 pb, *P. vivax* 783 pb, *P. ovale* 794 pb, *P. knowlesi* 807 pb, *P. cynomolgi* 785 pb.

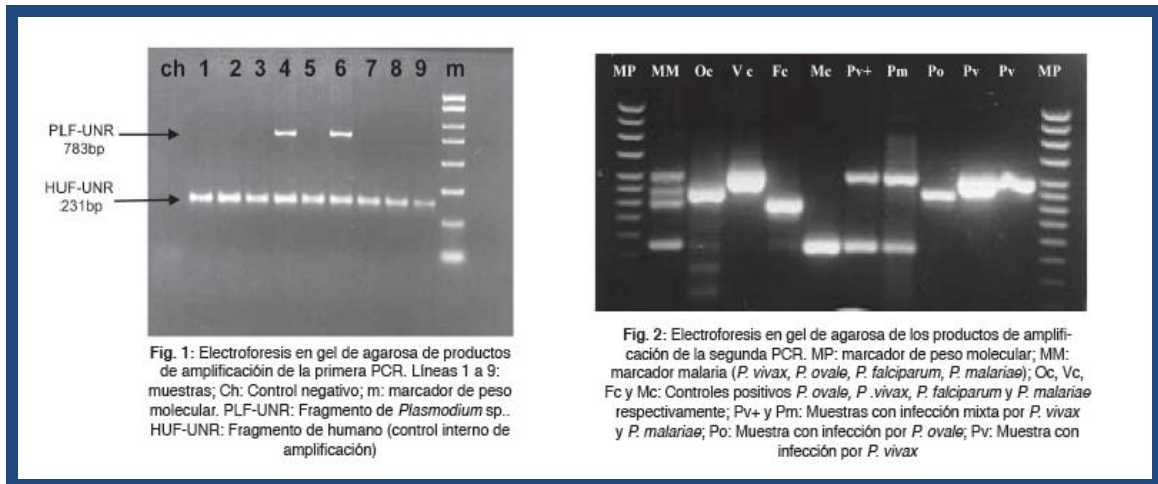


Figura 1. Resultados de la primera y segunda PCR de la Nested Malaria PCR. Imagen tomada de Ta-Tang *et al.*, (2011)

### 2.2.3 Real Time Malaria PCR (RT- Malaria -PCR).

La Malaria RT-PCR diseñada en el Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis emergentes para el diagnóstico de especies de malaria humanas y no humanas usa los cebadores de la primera amplificación de la Nested-Malaria PCR (PLF y REV) y como sistema para la detección en tiempo real combina Eva Green I y tres sondas de hidrólisis (sondas Taqman): una sonda específica del género *Plasmodium* y dos sondas específicas de especies para *P. falciparum* y *P. vivax* respectivamente (Figura 2).

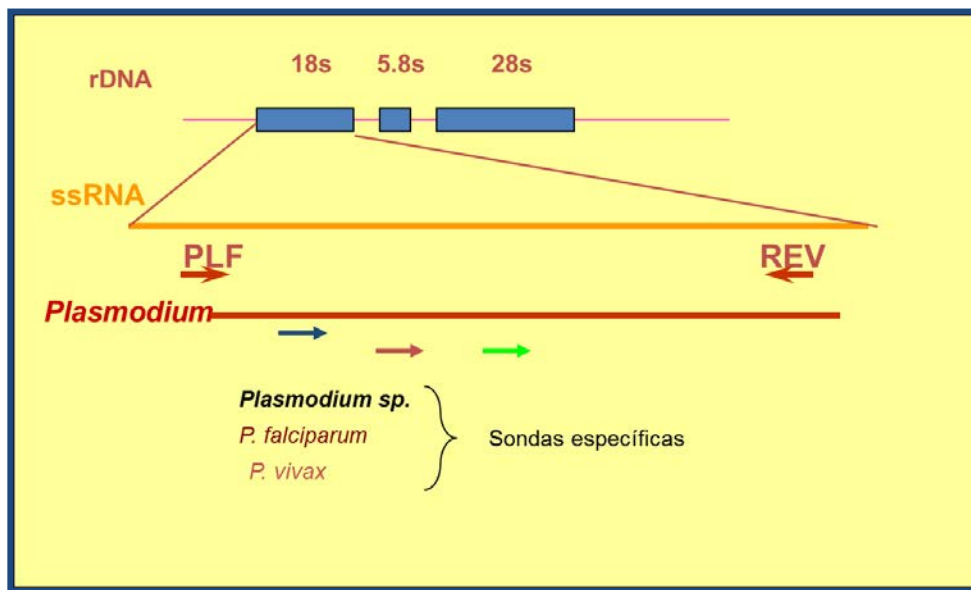


Figura 2. Esquema del diseño de la RT- Malaria-PCR.

En la siguiente tabla se resume las características principales de cebadores y sondas integrantes de la RT- Malaria-PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los cebadores y sondas de la RT-Malaria-PCR con sus características principales, especificidad, canal de lectura y concentración final.

Nombre	Secuencia	Especificidad	Canal de lectura (nm)	[ $\mu$ M]
PLF*	AGTGTGTATCAATCGAGTTTC	Plasmodios	-----	1
REV	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal	-----	1
NewPLF 2S3	Cy5-TCGATTCCGGAGAGGGAGC-BHQ2	Plasmodios	Rojo (625-660)	0,1
FAL forwC	TxRd-CTATTCTAGGGGAAGTATTTAGCTTTTCGC-BHQ2	<i>P. falciparum</i>	Naranja (585-610)	0,3
VIV 2Fc	Cy5.5-TCTTTGCTTCGGCTTGAAGTC-BHQ2	<i>P. vivax</i>	Crimson (680-710)	0,1

Las condiciones de amplificación constan de tres fases muy delimitadas. La primera es una preincubación de 10 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN y

activar la enzima termoestable. La segunda es la fase de amplificación cíclica que consiste en 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C (lectura de sondas en canales rojo, naranja y carmesí) y 30 segundos a 68°C. La lectura de la fluorescencia se debe de hacer en la fase de alineamiento para las sondas en los canales rojo, naranja y carmesí y en la extensión para la lectura de la fluorescencia emitida por el Eva Green en el canal verde. La tercera fase es la fase de melting o desnaturalización que se establece desde los 70 a los 90°C subiendo la temperatura de 0,5°C cada 5 segundos realizando la lectura de fluorescencia para el Eva Green en el canal verde en cada paso. La amplificación se realiza en un equipo Corbett®-Rotor Gene™ 6000 con cinco filtros de detección más uno para desnaturalización de alta resolución (HRM).

La mezcla de reacción consiste en 1x Quantimix Probe (Biotools B&M Labs, Madrid, España), donde se incluye el buffer de reacción, la enzima termoestable, los nucleótidos y el Mg, los cebadores y sondas a las concentraciones indicadas en la tabla 3, 1x de Eva Green (EvaGreen® Dye, 20x in water, Biotium, Inc. Hayward, CA 94545 U.S.A), 5µl de ADN y agua hasta completar el final volumen de 20µl.

#### 2.2.4 Nested-Filaria PCR

La diana del método fue el espaciador intergénico 1 (ITS-1) del ADN ribosómico y las regiones flanqueantes del 18S y 5,8S donde se diseñaron los cebadores en las zonas conservadas. Se diseñaron cuatro cebadores, dos externos (1ª PCR: FIL-1F y UNI-1R) y dos internos (2ª PCR: FIL-2F y FIL-2R), a partir del alineamiento y análisis de diferentes secuencias de filarias y grupos afines de la subunidad pequeña del ADN ribosómico (18S), del gen 5,8S y de los espaciadores internos (ITS1, ITS2), obtenidas del banco de secuencias GenBank/EMBL con el paquete informático Bioedit 7.1 y con el programa de alineamiento de secuencias Clustal W (Tang *et al.*, 2010).

La mezcla de reacción para ambas reacciones consiste en 75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 µM dNTP, cebadores de la PCR, 1.25 units of *Taq* DNA polymerase (Biotools B&M Labs, Madrid, España), ADN molde en un volumen final de 50 µl. Para la primera amplificación se usa 5 µl del ADN aislado por QIAgen y 0,5 µM de cada cebador (FIL-1F y UNI-1R). Para la 2ª PCR se usa 2 µl de la 1ª PCR y 0,02 µM del cebador FIL-2F y 0,04 µM del cebador FIL-2R.

Las condiciones de amplificación son una desnaturalización inicial de 7 minutos a 94°C seguido de (1ª PCR) 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C y

30 segundos a 72°C, o (2° PCR) 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 50°C y 20 segundos a 72°C. Completándose la amplificación en ambos casos con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tabla 4. Secuencia nucleotídica, especificidad y localización de los cebadores de la Nested-Filaria PCR y tamaño de los fragmentos esperados.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Especificidad	Posición en la secuencia de referencia	Tamaño producto de PCR (pb)
UNI-1R	CGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCG	Universal	AF228575: 631 (5.8S)	712-771 <sup>a</sup>
FIL-1F	GTGCTGTAACCATTACCGAAAGG	Filarias	AF227234: 1446 (18S)	
FIL-2F	GGTGAACCTGCGGAAGGATC	Universal	AF228575: 173 (18S)	286-344 <sup>b</sup>
FIL-2R	TGCTTATTAAGTCTACTTAA	Filarias	AF228575: 493 (ITS1)	

<sup>a</sup> Tamaño del fragmento amplificado por especie: *Onchocerca volvulus*: 771 pb, *Mansonella perstans*: 739 pb, *Mansonella ozzardi*: 734 pb, *Wuchereria bancrofti*: 723 pb, *Loa loa*: 712 pb

<sup>b</sup>: Tamaño del fragmento amplificado por especie *O. volvulus*: 344 bp, *M. perstans*: 312 bp, *M. ozzardi*: 305 bp, *W. bancrofti*: 301 bp, *Loa loa*: 286 bp; *M. streptocerca*: 270 pb.

Opcionalmente los productos de PCR se pueden digerir con *Taq I* para permitir una mejor diferenciación de los diferentes fragmentos en geles de agarosa al 2,5% (Tabla 5).

Tabla 5. Tamaños de los fragmentos obtenidos después de la digestión de los productos de amplificación de la Nested-Filarias PCR con *Taq I*

ENZIMA	M.o (305 pb)	M.p (312 pb)	Ov (Brasil 344 pb)	O.v (Argentina 340 pb)	W.b (301 pb)	L.I (286 pb)	B.m (324 pb)
<b><i>TaqI</i></b>	32, 75, 198	72, 240	25, 57, 262	25, 57, 258	67, 234	25, 67, 194	68, 256

### 2.2.5 Real Time Filaria PCR

La RT Filaria -PCR es una adaptación de la Nested-Filaria PCR con la inclusión de un tercer cebador para mejorar la detección de *Loa loa* (Ta *et al.*, 2015 sometido).

Las condiciones de amplificación son 95°C durante 3 minutos de desnaturalización inicial seguido de 45 ciclos de amplificación (95°C 10 segundos, 50°C 15 segundos, 60°C 15 segundos y 75°C 3 segundos) y una desnaturalización final o fase de melting desde los 70 a los 90°C subiendo la temperatura de 0,5°C cada 5 segundos realizando la lectura de fluorescencia para el Eva Green en el canal verde en cada paso. La amplificación se realiza en un equipo Corbett®-Rotor Gene™ 6000

con cinco filtros de detección más uno para desnaturalización de alta resolución (HRM).

La mezcla de reacción consiste en 1x Quantimix Easy Probes (Biotools, B&M Labs, S.A., Spain), 0.2  $\mu\text{M}$  de los cebadores FIL2-F e ITS1-F BIS (5'-GGTGAACCTGCRGMWGGATC-3') y 0.375  $\mu\text{M}$  del cebador FIL2-R, 1x Eva Green (EvaGreen® Dye, 20x in water, Biotium, Inc. Hayward, CA 94545 U.S.A), 5  $\mu\text{l}$  del ADN asilado y se completa hasta el volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con agua destilada

Una muestra se considera positiva a filaria/s cuando la  $T_m$  (temperatura de melting) es de  $77-78^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

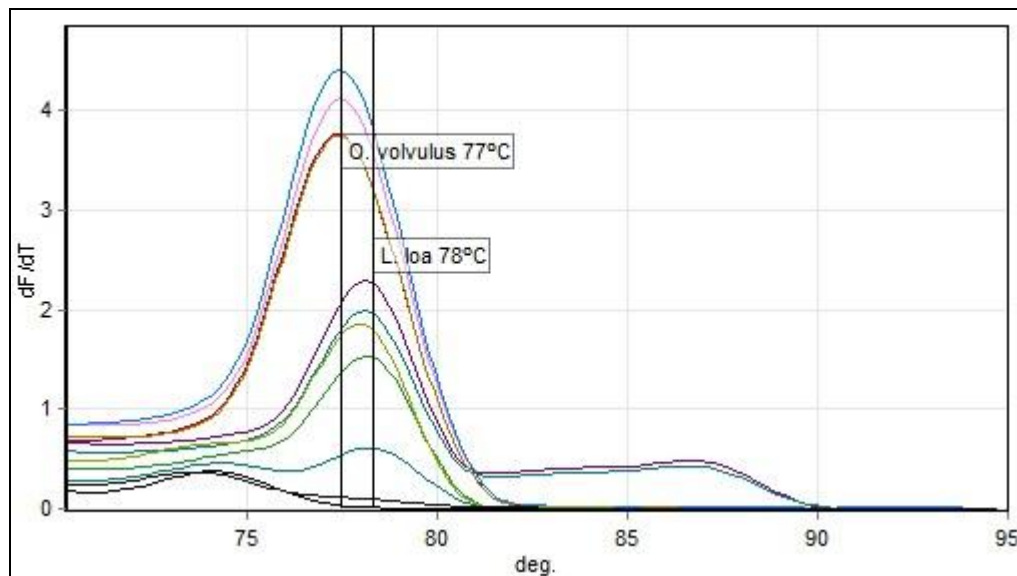


Figura 3. Análisis de la curva de desnaturalización de los fragmentos obtenidos en la RT Filaria PCR.  $T_m$  entre  $77-78^\circ\text{C}$  indica infección por una filaria.

## 2.2.6 Visualización de los fragmentos de ADN amplificados

### *Electroforesis en gel de agarosa*

Los geles se preparan al 2,5% de agarosa (Agarosa D5 Pronadisa®) en solución tampón TAE 0,5% (Tris Acetato EDTA) teñidos con Pronasafe 1x (Pronadisa®). Los productos amplificados (20  $\mu\text{l}$ ) mezclados con tampón de carga (Loading Buffer 6x) se cargan en los pocillos. El voltaje aplicado en la electroforesis fue de 110-

120 durante 45-60 minutos. Los fragmentos se visualizan con luz ultravioleta y se analizan con el Software QuantityOne versión 4.4.0 en el sistema de documentación de geles (Gel Doc 2000 BioRad®).

#### *Sistema automatizado QIAxcel® System*

QIAxcel® System es un sistema automatizado para análisis de fragmentos de ADN y ARN que utiliza electroforesis multicapilar en cartuchos prefabricados de gel de acrilamida. La señal fluorescente emitida por las moléculas de ADN al unirse al fluoróforo (bromuro de etidio) al pasar por el capilar es detectada y medida por un detector de fluorescencia. La separación de los ácidos nucleicos por tamaño es rápida, segura, cómoda (la carga de las muestras es automática) y con alta resolución de separación de fragmentos (3-5 pb para fragmentos menores de 0,5 kb). Puede analizar hasta 96 muestras en cada proceso y requiere sólo un volumen de 0,1 µl para el análisis, ahorrando así muestra de PCR. Los fragmentos se visualizan en un electroferograma e imagen del gel mediante el Software QIAxcelBiocalculator Software versión 3.0 (QIAgen).

"

### **2.3 Purificación y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados**

El ADN a secuenciar se obtiene por purificación de ADN amplificado, bien en solución o directamente desde el gel de agarosa, con kits comerciales (Kit Illustra DNA y Gel Band Purification Kit de General Electric Healthcare, Reino Unido), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A una columna GFX MicroSpin con su tubo colector se colocan 500 µl de Buffer de captura 3 y se transfiere el producto de reacción de PCR (volumen máximo 100 µl). Se mezcla bien y se centrifuga a 13.000 rpm 30 segundos. Se descarta el centrifugado. Se añaden 500 µl de Wash Buffer tipo 1 y se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos. Se coloca la columna en un tubo de rosca de 1,5 ml y se añade el mismo volumen de agua destilada estéril que el volumen inicial de muestra. Se incuba 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a máxima velocidad otro minuto obteniéndose el ADN purificado en el tubo colector. El ADN se puede guardar a 4°C hasta su uso.

Si partimos de ADN a partir de geles, previamente hay que disolver la agarosa a 60°C con el Buffer de captura 3 (por cada 10 mg de agarosa, 10 µl de buffer),

volumen máximo 800 µl. Una vez disuelto se transfiere a la columna GFX MicroSpin y continuar con el protocolo descrito

La secuenciación se realizó mediante el método de secuenciación cíclica, modificado a partir del método original de Sanger, con el kit comercial Big-Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Perkin Elmer Biosystems) en un analizador de ADN ABI PRISM 3700, siguiendo las recomendaciones del fabricante y de la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología.

Para la reacción de secuenciación se añade 3,2 pmoles del cebador, 1-2 µl de premix ABI BigDye, 3 µl de buffer 5x (contiene cationes de  $Mg^{+2}$ ), 1-5 µl de ADN amplificado y se completa con agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 µl.

Las condiciones de la PCR de secuenciación son 1 minuto a 94°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a la 50-56°C y 4 minutos a 60°C. Se recomienda mantener los productos obtenidos a 4°C.

Las secuencias se optimizan, se identifican, analizan y caracterizan mediante el algoritmo BLAST (Altschul et al, 1990) para comparar con la base de datos GenBank de forma remota y con el paquete BioEdit versión 7.10 (Hall, 1999) que contiene el programa para alineamiento de secuencias Clustal X (Higgins, 1988; Higgins *et al.*, 1994) entre otros.

## 2.4 Determinación de la Especificidad y Sensibilidad de los métodos

Para analizar los datos en este trabajo, se revisaron fundamentalmente los conceptos que determinan la validez de un test (sensibilidad y especificidad) y su seguridad (valores predictivos positivos y negativos). Para calcular estos valores se han empleado tablas de contingencia 2x2 en donde se enfrentan los resultados de la prueba de referencia o “gold standard” con los del método a ensayar. El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo) (Altman *et al.*, 1994).

**Sensibilidad:** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. En la tabla de 2x2 se calcularía por la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica. También se le conoce como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”.



"

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

**Especificidad:** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos. También conocido como "fracción de verdaderos negativos (FVN)".

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica (son propiedades intrínsecas del método). Sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información a priori acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo o negativo en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo o realmente sano? Los valores predictivos responden a esta pregunta.

**Valor predictivo positivo:** es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falso positivos}}$$

**Valor predictivo negativo:** es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falso Negativos}}$$

Los valores predictivos, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presenta la limitación de que dependen en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad a diagnosticar en la población objeto de estudio, es decir, de la **prevalencia**. Si la prevalencia es alta, un resultado positivo tiende a confirmar la presencia de la enfermedad, mientras que si la prevalencia es baja, un resultado positivo no permitirá afirmar su existencia.

## **IV. RESULTADOS**

#### IV.1. PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE LAS CINCO ESPECIES DE MALARIA HUMANA

T. Ta<sup>1</sup>, M. Lanza<sup>1</sup>, JM. Rubio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes (MAPELab). Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

**PALABRAS CLAVE:** Microscopía, PCR a tiempo real, EVA Green I, sondas Taqman, *Plasmodium spp.*, malaria humana, malaria zoonótica.

#### INTRODUCCIÓN

Las técnicas moleculares basadas en la detección de ADN representan una buena alternativa a la microscopía para el diagnóstico de malaria, con alta sensibilidad y especificidad sin necesidad de requerir de personal experto, como en la microscopía, una vez estandarizado.

Las PCRs (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el diagnóstico de malaria nacieron alrededor de 1990 con diferentes cebadores, diferentes métodos de extracción de ADN y diferentes métodos de detección (Snounou *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 2002) y demostraron ser métodos cuyos resultados eran muy fiables y muy útiles en situaciones de baja parasitemia o de infecciones mixtas (Rubio *et al.*, 1999; Runsewe-Abiodun *et al.*, 2012).

A pesar de que la PCR ha superado dos de los grandes problemas de la microscopía, sensibilidad (5-20 parásitos/ $\mu$ l en manos muy expertas) y especificidad (dificultad de detección y diferenciación en infecciones mixtas), su aplicación como método rutinario de diagnóstico sigue estando evaluada debido a la complejidad del método y de la necesidad de un técnico entrenado. Hoy en día se restringe sólo a los Centros de Referencia (Morassin *et al.*, 2002).

Con la introducción de la PCR en tiempo real en el año 2001 (Hermesen *et al.*, 2001), un método más automatizado, sin muchos pasos complejos y sin el requerimiento de técnicos muy cualificados, se espera un mayor uso y distribución de la metodología (Lee *et al.*, 2002; Rougemont *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005).

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior, de ahí su rapidez. Gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante (Gama *et al.*, 2007).

Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, y éste a su vez es proporcional a la cantidad de ADN inicial. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). La cuantificación de una muestra clínica es importante para estimar pronóstico clínico y monitorización de la respuesta al tratamiento particularmente en áreas donde se conoce resistencia a los antimaláricos.

Asimismo, la determinación de mutaciones puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes (el más empleado es el EVA Green) y sondas específicas marcadas con fluorocromos (un donador y un aceptor), diseñadas de manera especial (Costa, 2004; Calderaro *et al.*, 2012; Mangold *et al.*, 2005).

La malaria sigue siendo altamente prevalente en países tropicales y subtropicales, afecta anualmente entre 124-283 millones de personas y causa entre 367.000-755.000 muertes, el 90% de los afectados se encuentran en África y la mayoría son niños menores de 5 años (OMS, 2015). En los países endémicos, los habitantes llegan a alcanzar un estado de premunidad, es decir, un estado capaz de controlar la parasitemia pero incapaz de eliminar del todo los parásitos de la circulación. Como resultado, estos individuos son portadores asintomáticos, actúan como reservorios porque pueden infectar a los vectores mosquitos y reintroducir la malaria en ciertas regiones (Vinetz & Gilman, 2002; Alves *et al.*, 2005). Esto puede tener un considerable impacto en el control de la malaria y en países desarrollados hace necesario el screening de todos los donantes de sangre.

Desde hace más de una década son cinco especies de *Plasmodium* los causantes de malaria en humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y el más reciente, *Plasmodium knowlesi*.

*P. knowlesi* cumple aproximadamente once años desde su descubrimiento por Singh y col. en el año 2004 como la quinta especie de *Plasmodium* causante de malaria en

humanos. Fruto de un descubrimiento casual durante una investigación molecular de casos atípicos de malaria por *P. malariae* en Kapit Health Division, Sarawak, Malasia Borneo en pacientes con mayor sintomatología y mayor parasitemia que los esperados para una infección por *malariae*, actualmente se sabe que *P. knowlesi* no sólo está confinado a Kapit division sino que se extiende por todo el sudeste asiático (Cox-Singh *et al.*, 2008; Luchavez, *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2008; Bronner, *et al.*, 2009; Ta *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2011; Hoosen & Shaw, 2011; Muller & Schlagenhauf, 2014).

Morfológicamente, *P. knowlesi* está enmascarado por su similitud en apariencia con *P. falciparum* en sus estadíos tempranos y con *P. malariae* en los estadíos tardíos (Lee K *et al.*, 2009; Sulistyaningsih *et al.*, 2010; Wilairatanal, *et al.*, 2010; Torrús *et al.*, 2015). Sólo las técnicas moleculares son capaces de discernir las especies lo que para la microscopía presenta dificultades (Oddoux *et al.*, 2011; Link *et al.*, 2012; Lucchi *et al.*, 2012).

Originariamente, *P. knowlesi* es un plasmodio de macacos de cola larga y cola corta. Bajo condiciones experimentales demostró ser infectivo para el ser humano (Coatney *et al.*, 1971). El primer caso de infección natural por *P. knowlesi* fue en el año 1965, diagnosticado retrospectivamente (Chinet *et al.*, 1965). No se registró ningún caso más hasta 40 años después, cuando se descubrió el gran foco, mediante técnicas moleculares, de infecciones por *P. knowlesi* adquiridos de forma natural por los habitantes de Sawarak (Malasia) (Singh *et al.*, 2004), casos que habían sido diagnosticados erróneamente por el más benigno de los plasmodios, *P. malariae*, una plasmodio mejor adaptado al huésped humano (Barber *et al.*, 2013; Ahmed & Cox-Singh, 2015).

En macacos (*Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina*) la infección cursa de forma crónica. En humanos la infección es más variada, va desde una infección asintomática (Van den, Eede, 2009), pasando por una malaria con sintomatología clásica (fiebre, cefalea, artromialgias, diarrea, dolor abdominal, vómitos o tos) (Askling *et al.*, 2012; Bartoloni & Zammarchi, 2012; Muñoz *et al.*, 2015) hasta llegar a malaria severa con casos fatales (Seilmaier *et al.*, 2014; William *et al.*, 2011). El grado de severidad está relacionado con la parasitemia y potencialmente puede causar malaria severa, al igual que *P. falciparum*, si no es tratado el paciente a causa de su ciclo eritrocítico asexual cotidiano (24 horas) (Daneshvar *et al.*, 2009; Daneshvar *et al.*, 2010; Ahmed & Cox-Singh, 2015). Hay que señalar que *P. knowlesi* no produce hipnozoítos, por tanto no hay riesgo de relapsos, sólo reinfecciones o fallo terapéutico.

El tratamiento de elección para la malaria por *knowlesi* es con cloroquina (25 mg/kg en 3 ó 4 dosis en 48 horas), también es sensible a artemisininas y sus combinaciones,

"

quinina y atovacuona/proguanil, pero responde mal a la mefloquina (Machado-Alba, 2015).

Dado que su identificación por microscopía es confusa e inespecífica (Barber BE et al., 2013) y su detección por los tests inmunocromatográficos sólo es posible con ciertos tests y con alta parasitemia (Barber et al., 2013b), actualmente los métodos moleculares son los más adecuados para la detección y diagnóstico de la infección por *P. knowlesi* (Chew et al., 2012; Imwong et al., 2009). El incremento de viajes internacionales al sudeste asiático por su atracción exótica y la globalización económica, hace necesario que en los países desarrollados incluyan un método fiable para su diagnóstico y tanto médicos como personal de laboratorio tengan en cuenta esta especie para hacer el diagnóstico diferencial, ya que está sobradamente demostrado, por los numerosos casos (Kantele & Jokiranta, 2011) que el hombre es susceptible de infectarse de forma natural por *P. knowlesi* (Bronner et al., 2009; Berry et al., 2011)

Este trabajo tiene como **objetivo** diseñar y validar una PCR a tiempo real para la detección de las especies de *Plasmodium*, principalmente las causantes de malaria humana y compararla con la Nested Múltiplex Malaria PCR (método de referencia actual) y determinar la sensibilidad y especificidad frente a la técnica actual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras sanguíneas

Se han estudiado 433 muestras de sangres periféricas (aproximadamente 5 ml) colectadas en tubos con anticoagulante EDTA (vacutainer tubes Becton Dickinson), enviadas al Laboratorio de Malaria (CNM-ISCIH) con sospecha de infección por malaria.

Para la validación de la Malaria-RT PCR se usaron muestras positivas como controles positivos al agente infeccioso a testar (desde niveles bajos hasta niveles altos) así como muestras positivas a otros parásitos distintos al que se quiere detectar pero que comúnmente pueden encontrarse en sangre

Como controles negativos muestras de sangre de individuos sanos negativos a malaria y a otras infecciones, y negativos a malaria pero positivos a otras infecciones bacterianas, víricas y parasitarias.

Los controles positivos y negativos proceden del Banco de muestras del Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes del Centro Nacional de Microbiología del

Instituto de Salud Carlos III. Con estos controles positivos y negativos se pretende evitar los falsos negativos y los falsos positivos debido a reacciones cruzadas.

## 2. Curva patrón para la cuantificación

Para realizar una curva patrón se tomó una sangre positiva a *P. falciparum* de parasitemia calculada por microscopía, se realizaron diluciones seriadas de 10 en 10 (hasta diluciones  $10^6$ - $10^7$ ) sobre sangre no infectada por ningún microorganismo, de individuos sanos con un nivel basal de glóbulos rojos. La extracción de material genómico se realizó de la muestra sin diluir y de las muestras diluidas en sangre negativa.

La parasitemia se calculó examinando al menos 20 campos con aceite de inmersión (objetivo 100x) de una extensión fina de sangre teñido con Giemsa al 10%. Se asume que 1  $\mu$ l de sangre contiene  $5 \times 10^6$  glóbulos rojos. Por tanto, 1% de parasitemia (1 glóbulo rojo parasitado por cada 100 glóbulos rojos) corresponde a 50.000 parásitos/ $\mu$ l.

## 3. Control endógeno o control positivo de referencia

La utilización de un control endógeno nos permite diferenciar los casos negativos de los falsos negativos por inhibición de la amplificación o pérdida de eficiencia de la reacción de PCR. El gen seleccionado es el 18S rARN humano (cebadores: HUF 5'-GAGCCGCCTGGATACCGC-3' + REV 5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y el tamaño del fragmento es de 231 pb. Nuestro control endógeno es a su vez el control positivo de extracción, nos permite evaluar eficiencia en la extracción de ADN y posterior amplificación y detección del mismo.

## 4. Extracción del material genético (ADN)

EL aislamiento de ADN (a partir de 200  $\mu$ l de sangre) se realizó mediante un sistema automatizado de columnas de 12 muestras (QIAcube™. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit. Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN fue eluido en 200  $\mu$ l de agua destilada y almacenada a 4°C hasta su uso.

## 5. Diseño de la Malaria RT-qPCR

La PCR a tiempo real diseñada para diagnosticar la infección por malaria usa como método de detección SYBR Green I y tres sondas de hidrólisis (sondas Taqman) específicas marcadas con fluorocromos: una sonda específica del género *Plasmodium* sp. y dos sondas específicas de especies *P. falciparum* y *P. vivax*. Las secuencias,



temperaturas y otras características de los cebadores y sondas se encuentran en Tabla 1.

El diseño de sondas específicas para su utilización en sistemas de PCR a tiempo real sigue principios similares al diseño de cebadores. En este caso, las condiciones pre-establecidas eran: a) especificidad de género *Plasmodium* y de especies *P. falciparum* y *P. vivax*; b) temperatura de hibridación 5°C (67°C) por encima de la de reacción (62°C); b) la longitud no debía exceder de 20 bases para favorecer el diseño de una sonda de marcado dual, donde el llamado quencher debe estar próximo al fluoróforo emisor.

Las recomendaciones son que el diseño de sondas se haga con algún programa informático como el AlleleID6 (Premier Biosoft International), pero por experiencia del laboratorio se observó que no ofrecían grandes ventajas entre usar un programa y realizarlo manualmente a partir de un buen alineamiento, por tanto se decidió diseñar las sondas para el diagnóstico de malaria a tiempo real de forma manual a partir del alineamiento de las secuencias del ADN ribosómico de plasmodios, humanos, rata y ratón. Posteriormente, se comprobaban en el laboratorio si estas sondas diseñadas cumplían las características deseadas.

Esta PCR a tiempo real usa como reactivos para la amplificación el *LightCycler® Faststart DNA Master SYBR Green I Kit. Roche Applied Science* y se lleva a cabo en el termociclador Corbett®-Rotor Gene™ 6000, formato para 36 muestras. Los resultados se analizaron con el Software versión Rotor-Gene 1.7.75. La Taq polimerasa LightCycler® Fast Start tiene una actividad Hot Start, así permite aumentar la sensibilidad y especificidad de la PCR, evitando la formación de productos de amplificación inespecíficos. Al ser una enzima Hot Start necesita ser activada previamente antes del programa de amplificación a 95°C 10 minutos.

El programa utilizado en la amplificación consta de tres pasos: 1º, preincubación de 10 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN y activar la enzima termoestable; 2º, amplificación cíclica de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C (lectura de sondas en canales rojo, naranja y carmesí) y 30 segundos a 68°C (lectura de Sybr Green en el canal verde); 3º, fase de Melting (70-90°C) donde se obtiene la curva de desnaturalización adquiriendo la fluorescencia también en el canal verde. El volumen final de reacción fue de 25 µl y concentración final de MgCl<sub>2</sub> 3mM.

En cada tanda de reacción de PCR, al igual que en la PCR convencional, se incluye una muestra positiva al parásito a testar, una muestra negativa (negativa a cualquier parásito o negativa al agente diana pero que puede ser positiva a otro agente muy parecido al parásito diana), nuestro blanco de extracción (sólo contiene agua destilada

"

estéril y que ha sufrido todos los pasos de extracción que las muestras), nuestro control negativo de PCR (master mix de reacción, no tiene material genético), nuestros controles positivos de PCR (diluciones de amplicones que proceden de otra reacción de PCR) y las muestras clínicas a testar. En la figura 1 se esquematiza el diseño de la Malaria RT-qPCR donde se muestra el gen usado como diana en la amplificación y posición de los cebadores y sondas en el dicho gen."

#### 6. Método de referencia: *Nested-Multiplex Malaria PCR*

Para la validación de la Malaria-RT PCR se toma como método de referencia la publicada por Rubio y col., 2002.

#### 7. Visualización de fragmentos amplificados

Opcionalmente se analizaron los amplicones en un sistema semi-automático (QIAxcel/ System®. QIAxcel Biocalculator Software versión 3.0. Qiagen).

#### 8. Purificación y secuenciación automática de fragmentos amplificados

En aquellos casos en los que fue necesario, el amplicón se purificó con Illustra DNA and Gel Band Purification Kit, General Electric Healthcare) y la secuenciación cíclica se realizó en el Big Dye Terminator v3.1 ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer.

#### 9. Análisis estadístico

Para analizar los datos en este trabajo, se revisaron fundamentalmente los conceptos que determinan la validez de un test (sensibilidad y especificidad) y su seguridad (valores predictivos positivos y negativos). Para calcular estos valores se han empleado tablas de contingencia 2x2 en donde se enfrentan los resultados de la prueba de referencia o "gold standard" (Nested-Multiplex Malaria PCR) con el método a ensayar (Malaria RT-PCR).

## RESULTADOS

Esta PCR en tiempo real desarrollada para el diagnóstico de especies de malaria humanas y no humanas usa los cebadores de la 1º PCR de referencia para malaria: PLF y REV. En un principio se probaron estos cebadores en la PCR en tiempo real usando la misma concentración que en la Nested Multiplex Malaria PCR (0,1 µM). Al no usar la PCR en tiempo real una PCR anidada se observó que la sensibilidad era bastante inferior a la PCR convencional.

Para mejorar la sensibilidad respecto a la Nested Multiplex Malaria PCR se aumentó la concentración de los cebadores a 1  $\mu$ M para cada uno (10 veces respecto a la PCR de referencia). Otro parámetro que se tuvo que ajustar fue la concentración de  $MgCl_2$ , que se tuvo que aumentar la concentración final de 2 mM de la PCR de referencia a 3 mM para la PCR en tiempo real.

Se excluyó el cebador HUF que amplifica el 18S rARN humano porque en las pruebas realizadas se vio que disminuía la sensibilidad del método cuando se trataba de muestras con muy baja parasitemia, esto ocurría especialmente con *P. malariae* y *P. ovale*.

De las 433 muestras analizadas, 100 (23,09%) muestras resultaron positivas y 325 (75,06%) muestras resultaron negativas por ambos métodos. 8 (1,85%) muestras dieron resultados discordantes: 6 (1,36%) fueron positivas por RT-Malaria PCR y negativa por la técnica de referencia y 2 (0,46%) fueron positivas por la técnica de referencia y negativa por RT-Malaria PCR (Tabla 2 y 3). La curva de desnaturalización (curva de fusión o Temperatura de Melting) para el fragmento de *Plasmodium* presenta una temperatura aproximada de  $84,5 \pm 0,25^\circ C$ .

La Malaria RT-qPCR presenta los siguientes valores estadísticos: S=0,980; E=0,982; VPP=0,943; VPN= 0,994. El índice Kappa obtenido es 0,9494 (grado de concordancia excelente). El índice de confianza (IC) presenta un valor de 95%, rango 0.9147-0.9841.

Para la cuantificación de las muestras se realizó una curva patrón partiendo de una muestra positiva a *P. falciparum* con 250.000 parásitos/ $\mu$ l (5% de parasitemia), haciendo diluciones seriadas de 10 en 10 la Malaria RT-qPCR es capaz de detectar < 1 parásito/ $\mu$ l (< 0.00002% parasitemia) (Figura 2).

## DISCUSIÓN

La búsqueda de un método muy sensible y específico como herramienta de diagnóstico para malaria sigue siendo un objetivo primordial para la Investigación Clínica. La PCR en tiempo real es una herramienta molecular que proporciona gran sensibilidad, una ventaja en casos de muy baja parasitemia y de infección mixta, además de ser un método rápido, seguro y eficiente para el diagnóstico de malaria, estudios epidemiológicos y ensayos sobre la eficacia de antimaláricos.

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior (Costa, 2004). Asimismo, mediante la detección por fluorescencia se puede

"

medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Este hecho permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Fabre *et al.*, 2004).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser agentes intercalantes inespecíficos como el EVA Green (Fabre *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005), o sondas específicas marcadas con fluorocromos que permiten la detección específica del producto amplificado (Muhamad *et al.*, 2011).

El EVA Green nos permite determinar a tiempo final la temperatura de desnaturalización o temperatura de melting ( $T_m$ ) de los fragmentos amplificados (la  $T_m$  depende de la longitud y composición de bases del producto amplificado)

El uso de sondas específicas disminuye los inconvenientes del EVA Green. Existen diferentes tipos de sondas y de sistemas de sondas. Los más conocidos son las sondas de doble marcaje o Taqman, los sistemas FRET y las sondas Molecular Beacon (Weiss, 1995; Costa, 2004)

En el laboratorio, ante las ventajas que ofrecen este tipo de métodos frente a la PCR convencional y al disponer de un equipo para realizar esta tecnología, se decidió poner a punto una PCR a tiempo real para el diagnóstico de malaria.

Aunque cuando comenzamos a instaurar esta metodología había muchas publicaciones acerca del diagnóstico a tiempo real para malaria (Fabre *et al.*, 2004; Perandin *et al.*, 2004; Rougemont *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2007) y lo sencillo sería adaptar el trabajo de otros autores a las condiciones de nuestro laboratorio, se decidió ajustar nuestra Nested-Multiplex Malaria PCR convencional, de la que ya se conocía su alta especificidad y sensibilidad, al formato de PCR a tiempo real.

El primer paso fue comprobar si utilizando un único proceso de amplificación se obtenían los mismos resultados de sensibilidad que la Nested Multiplex Malaria PCR. Para la especificidad se decidió usar los cebadores de mayor temperatura de hibridación (PLF y REV) (Tabla 1).

Un factor esencial en el diseño de una PCR a tiempo real, y que no ocurre con la PCR convencional, es tener en cuenta las características del equipo con el que se va a trabajar, ya que dependiendo del número de filtros de detección, de su versatilidad para diferentes químicas y otras características como el diseño pre-establecido puede no ser adaptable al equipo. El equipo de PCR a tiempo real que se ha utilizado es el termociclador Corbett®-Rotor Gene™ 6000 (Software versión Rotor-Gene 1.7.75) formato para 36, dispone de seis filtros incluido el HRM (High Resolution Melting: Curva de desnaturalización de alta resolución). Este equipo es un sistema libre que

permite utilizar cualquier kit de amplificación y marcado de sondas además de SYBR® Green I.

### **Selección de los fluorocromos para el diseño de sondas para Malaria RT-qPCR**

En el diseño de la PCR a tiempo real es esencial decidir el sistema de detección de la amplificación para ver si éste va a ser por sonda o por fluorocromo intercalante, ya que la especificidad y sensibilidad de la técnica depende en muchos casos de esta elección. En un principio se decidió diseñar un sistema mixto, con EVA Green y con sondas específicas: uno de género *Plasmodium*, y dos de especies, *P. falciparum* y *P. vivax*. Este sistema nos permitía tener una alta especificidad por las sondas, y en paralelo observar fluorescencia con el EVA Green en caso de amplificación como método complementario, a la vez que podíamos calcular la  $T_m$  para el grupo *Plasmodium*. Todas las sondas diseñadas para esta PCR a tiempo real son de tipo *Taqman*.

La razón de usar esas tres sondas, cada uno emitiendo fluorescencia en un canal diferente suficientemente alejados sus espectros de absorción/emisión para evitar solapamientos y así los falsos positivos, es porque con la sonda del género *Plasmodium sp.* podemos detectar un amplio rango de parásitos de malaria, tanto los causantes de infección en humanos como cualquier otro tipo de plasmodio no humano (esto es por el uso de un cebador directo en una zona homóloga a todos los plasmodios, y un cebador antisentido universal). Se eligieron esas sondas de especies porque *P. falciparum* y *P. vivax* son las especies cuya distribución y prevalencia son las mayores de entre todas las especies de malaria, 50% y 40-45% respectivamente frente a 5% y 7% de *P. ovale* y *P. malariae* respectivamente. La prevalencia de *P. knowlesi* en humanos no está muy bien determinada, sigue siendo un debate porque todo depende del método que se use para identificarlo y el país donde se realice el estudio (Khim et al., 2011; Ahmed & Cox-Singh, 2015), se conoce que en macacos es de aproximadamente un 8%. Además, *P. falciparum* es una de las especies de malaria más virulentas en humanos pudiendo causar casos severos como la malaria cerebral y coma. Y un último motivo es porque en nuestro laboratorio son las especies que mayoritariamente se detectan, por otro lado las infecciones causadas por *P. ovale* y *P. malariae* son sin duda en mucho menor número. De cualquier manera ninguna especie se nos escaparía al diagnóstico porque sería detectada por la sonda de *Plasmodium*, y tendríamos la señal del SYBR® Green I que nos permitiría calcular la  $T_m$  como un método adicional.

La sonda de detección específica de género *Plasmodium* denominada *NewPLF2S3* está marcada con el donador Cy5 que emite fluorescencia en el canal rojo

"

(excitación/emisión 650/670 nm); para la sonda *FALforwC* (específica de *P. falciparum*) se eligió el donador Texas Red que emite señal en el canal naranja (excitación/emisión 585/605 nm), y la sonda *VIV2Fc* (específica de *P. vivax*) tiene como fluorocromo el Cy5.5 que emite señal fluorescente en el canal crimson (carmesí) (excitación/emisión 685/712 nm).

Se eligieron esos marcadores porque por los espectros de absorción y emisión no se interfieren entre sí y tampoco se superponen a la emisión de fluorescencia del SYBR® Green I en el canal verde, además por los experimentos han demostrado tener la mayor emisión de fluorescencia y mayor sensibilidad. Así, se decidió que estos serían los sistemas de detección a usar en la Malaria RT-qPCR porque cumplen las condiciones previas, no hay invasión de señales en el canal no correspondiente permitiendo así la utilización en paralelo de 3 sondas más EVA Green (excitación/emisión 430/510 nm).

### **Optimización del método para el diagnóstico de malaria por PCR a tiempo real**

Toda reacción de amplificación genómica debe ser optimizada para alcanzar los resultados óptimos, así como para evitar las amplificaciones inespecíficas o erróneas como ya se comentó previamente. En el caso de la PCR a tiempo real, se consideró la optimización de muchas variables tanto las llamadas químicas o componentes de reacción, como de las físicas o condiciones de amplificación.

Existen dos factores que se han mostrado limitantes de la técnica y que su influencia no es tan grande en los sistemas de PCR convencional. Un factor que se ha mostrado altamente limitante es el kit de amplificación para tiempo real utilizado, hasta tal punto que con kits diferentes procedentes del mismo laboratorio fabricante se han obtenido resultados totalmente dispares. Incluso, por experiencia, hemos observado que en algunas ocasiones diferentes lotes del mismo kit, o por el efecto de congelación/descongelación los resultados también se ven alterados.

Esto sugiere que la mezcla de la enzima polimerasa con los otros componentes de la reacción (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Buffer de reacción) de cada kit condicionan la amplificación, especialmente cuando se tratan de fragmentos grandes (>500 pb) como lo fue en nuestro caso, que para la Malaria RT-qPCR usando los cebadores PLF y REV el fragmento amplificado es de unos 800 pb, mayor del que recomiendan los fabricantes. Al amplificar un fragmento tan grande disponíamos de un número muy limitado de kits, y el único que reunía las condiciones de sensibilidad y especificidad que queríamos fue el *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Applied Science).

"

Tuvimos que aumentar 10 veces la concentración de los cebadores PLF/REV (de 0,1  $\mu$ M a 1  $\mu$ M) para acercarnos lo más posible a la sensibilidad de la Nested Malaria PCR convencional, y por la misma razón eliminamos finalmente el cebador HUF que amplifica un fragmento de 231 pb del ADN ribosómico humano. La temperatura de hibridación se consiguió mantenerlo a 62°C, igual que en la PCR convencional, pero hubo que modificar un factor químico que fue la concentración de  $MgCl_2$ , se pasó de 2mM a 3mM de concentración final. Aunque este kit tenía incorporado SYBR® Green I, decidimos aportar una cantidad extra para aumentar la señal de fluorescencia, concretamente un 0,2x adicional a la cantidad que ya contenía el kit, y sin producir interferencias a las señales de las sondas.

Otro factor limitante de la técnica es la calidad de ADN. Los sistemas de PCR a tiempo real son altamente sensibles, por lo que la calidad del ADN les puede afectar notablemente, especialmente en estudios de cuantificación y en muestras en el límite de sensibilidad de la técnica. El método de aislamiento del ADN determina su pureza, tal es su influencia que en sistemas diferentes al método de extracción genómica por columnas se llega a observar una inhibición de la reacción, como es el caso de la extracción de ADN por chelex. Por este motivo se decidió por el método de *QIAgen*®, que se puede realizar manualmente o de forma automatizada con el robot *QIACube*™. Otros factores a tener especial consideración al optimizar una PCR a tiempo real son:

1. Concentración de  $Mg^{+2}$ : tiene un efecto directo en la calidad y especificidad de cualquier reacción de amplificación, pero en el caso de la PCR a tiempo real, este efecto es todavía mayor cuando se utiliza SYBR® Green I, ya que este fluoróforo tiene afección por el  $Mg^{+2}$  y lo retira de la reacción, con lo que es necesario aumentar la concentración del mismo.

2. Concentración de cebadores: en este tipo de PCR es importante minimizar al máximo los efectos de "dimerización de cebadores", especialmente cuando se trabaja con SYBR® Green I, con el fin de evitar visualización de fluorescencia inespecífica.

En definitiva, al igual que en toda reacción de amplificación, se deben optimizar otros componentes y pasos de reacción desde la temperatura de hibridación hasta el número de ciclos, pasando por la concentración de sondas y del SYBR® Green I. En los diseños de PCR a tiempo real se debe, además, tener especial consideración en la optimización el tipo de kit de amplificación y el método de aislamiento de material genómico, que son los dos factores limitantes de la reacción, junto con el equipo utilizado.

### **Sensibilidad y especificidad del método para el diagnóstico de malaria por PCR a tiempo real.**

Una vez optimizado el método, al igual que en cualquier otro método de diagnóstico, se debe comprobar la especificidad del mismo. El método diseñado de PCR a tiempo real para el diagnóstico de malaria, aunque está basado en los mismos cebadores que la 1ª PCR de la Nested Multiplex Malaria PCR y no se esperan variaciones en la especificidad del mismo, éste se comprobó igualmente utilizando muestras de sangres de diferentes pacientes infectados con distintas parasitosis. No se obtuvieron en ningún caso amplificaciones inespecíficas.

Las sondas también mostraron una alta especificidad y mostraban sólo fluorescencia cuando se trataban de bandas amplificadas correspondientes a *Plasmodium*, en el caso de la sonda NewPLF2S3, y cuando se trataban de *P. falciparum* (sonda Fal forwC) o *P. vivax* (sonda Viv 2Fc).

De forma añadida, cuando se hacía el análisis de la curva de desnaturalización de los fragmentos obtenidos mediante la fluorescencia emitida por el EVA Green, se podía observar de una forma notable que los fragmentos correspondientes a plasmodios tenían una temperatura de desnaturalización de  $84,5 \pm 0,25^\circ\text{C}$ . Esto sólo era un dato complementario a los datos generados por las sondas, realmente lo que nos confirma y da la especificidad del método son las sondas, ya que como se mencionó anteriormente el EVA Green es un fluoróforo inespecífico y puede proporcionar falsos positivos. A pesar de esta inespecificidad, observamos que en la mayoría de los casos (aproximadamente un 90%), los resultados de EVA Green y sondas eran coincidentes, permitiéndonos en muchos casos utilizar ambos sistemas de detección como un doble filtro.

Se validó el método con 433 muestras de sangre y se realizó en paralelo a la Nested Multiplex Malaria PCR, técnica de referencia en nuestro laboratorio. Se realizó una curva patrón diluyendo una muestra positiva, en nuestro caso seleccionamos la especie *P. falciparum* para hacer la curva patrón porque es: primero por ser la especie mayoritaria que se detecta en nuestro laboratorio con lo cual tenemos más probabilidades de disponer de ella; segundo porque es la especie que mayor parasitemia da en humanos y por tanto para calcular la parasitemia por microscopía es más adecuado. Con esta curva patrón se pretendía calcular la sensibilidad del método. Se llegó a una sensibilidad de 0,1 parásitos/ $\mu\text{l}$  (0,000002%), aunque esta sensibilidad no era mala considerando que era 1000 veces mayor que la microscopía (la media de límite de detección en la mayoría de los microscopistas es de 100 parásitos/ $\mu\text{l}$  y sólo en manos muy expertas se llega a 5 parásitos/ $\mu\text{l}$ . Moody, 2002; Ohrt *et al.*, 2008) ésta



no era suficiente pues no se igualaba a la sensibilidad de la técnica de referencia la cual era 10 veces más sensible (0,01 parásitos/ $\mu$ l).

Estadísticamente se obtiene unos resultados que muestran un grado de concordancia excelente en comparación con la Nested Multiplex Malaria PCR, y ha demostrado ser una técnica muy similar a la de referencia a pesar de que no se llega a igualar la sensibilidad, a estos resultados se tiene que añadir las ventajas de la PCR a tiempo real, menos laboriosa y acorta tiempos.

Otra gran ventaja de este método es su capacidad para detectar tanto especies de *Plasmodium* humanos como no humanos debido a los primers género-específico y sonda género-específico que hibrida con cualquier amplicón de parásitos de malaria humano y no humano. Así es como de forma casual, durante la validación del método, detectamos e identificamos el primer caso de *P. knowlesi* en España (Ta et al., 2010). De no tener la PCR en tiempo real y disponer sólo de la PCR convencional, este caso clínico nunca se hubiera detectado puesto que la Nested-Multiplex Malaria PCR dio negativo a esta muestra todas las veces que se repitió. Dado que la parasitemia era muy baja (250 parásitos/ $\mu$ l) la 1ª PCR de la Nested-Multiplex Malaria PCR no dio banda de *Plasmodium spp.* Los clínicos no sospecharon tampoco de malaria porque el examen microscópico realizado en el hospital era negativo y porque el paciente tomó profilaxis (primero mefloquina y después Malarone® aunque sólo cumplió el 80% de la profilaxis). Sospecharon principalmente de alguna infección vírica. Sólo la Malaria RT-qPCR fue capaz de llegar al diagnóstico definitivo y certero.

Con todo esto, se podría concluir que es un método que podría ser usado para el diagnóstico de manera rutinaria o en su defecto para aquellas situaciones en las que se requiere una respuesta rápida, segura y eficaz, pues se ha demostrado que es altamente específica y suficientemente sensible con dos sistemas de detección, por sondas específicas y como adyuvante la temperatura de desnaturalización. Además es posible correr el producto amplificado en un gel de agarosa o en sistemas automatizados para análisis de fragmentos de ADN y determinar la especificidad del producto amplificado.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con la Malaria RT-qPCR muestran un grado de concordancia excelente respecto a la técnica Gold Standard según el índice Kappa. Según el análisis estadístico realizado, la Malaria RT-qPCR es un método muy similar a la técnica de referencia (Nested-Multiplex Malaria PCR). La técnica de referencia es

"

laboriosa y larga, inconvenientes que se pretenden evitar con la Malaria RT-qPCR pues unas de sus principales ventajas es su facilidad de realización y rapidez.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, M. A.; Cox-Singh, J. - an Emerging Pathogen. ISBT. Sci Ser. 2015, 10, 134-140.
2. Alves, F. P.; Durlacher, R. R.; Menezes, M. J.; Krieger, H.; Silva, L. H.; Camargo, E. P. High Prevalence of Asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Infections in Native Amazonian Populations. Am J Trop Med Hyg. 2002, 66, 641-648.
3. Askling, H. H.; Bruneel, F.; Buchard, G.; Castelli, F.; Chiodini, P. L.; Grobusch, M. P.; Lopez-Velez, R.; Paul, M.; Petersen, E.; Popescu, C.; Ramharther, M.; Schlagenhauf, P. Management of Imported Malaria in Europe. Malar. J 2012, 11, 328.
4. Barber, B. E.; William, T.; Grigg, M. J.; Piera, K.; Yeo, T. W.; Anstey, N. M. Evaluation of the Sensitivity of a PLDH-Based and an Aldolase-Based Rapid Diagnostic Test for the Diagnosis of Uncomplicated and Severe Malaria Caused by PCR-Confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. J Clin Microbiol 2013.
5. Barber, B. E.; William, T.; Grigg, M. J.; Yeo, T. W.; Anstey, N. M. Limitations of Microscopy to Differentiate Plasmodium Species in a Region Co-Endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. Malar. J 2013, 12, 8.
6. Bartoloni, A.; Zammarchi, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. Mediterr. J Hematol. Infect Dis 2012, 4, e2012026.
7. Berry, A.; Iriart, X.; Wilhelm, N.; Valentin, A.; Cassaing, S.; Witkowski, B.; Benoit-Vical, F.; Menard, S.; Olganier, D.; Fillaux, J.; Sire, S.; Le Coustumier, A.; Magnaval, J. F. Imported *Plasmodium knowlesi* Malaria in a French Tourist Returning From Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2011, 84, 535-538.
8. Bronner, U.; Divis, P. C.; Farnert, A.; Singh, B. Swedish Traveller With *Plasmodium knowlesi* Malaria After Visiting Malaysian Borneo. Malar. J 2009, 8, 15.
9. Calderaro, A.; Piccolo, G.; Gorrini, C.; Montecchini, S.; Rossi, S.; Medici, M. C.; Chezzi, C.; Snounou, G. A New Real-Time PCR for the Detection of *Plasmodium ovale wallikeri*. PLoS. One. 2012, 7, e48033.
10. Chew, C. H.; Lim, Y. A.; Lee, P. C.; Mahmud, R.; Chua, K. H. A Hexaplex PCR Detection System for the Identification of Five Human *Plasmodium* Species With Internal Control. J Clin Microbiol 2012.
11. Chin, W.; CONTACOS, P. G.; COATNEY, G. R.; KIMBALL, H. R. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science 1965, 149, 865.
12. Costa, J. [Real-Time PCR]. Enferm. Infect. Microbiol Clin 2004, 22, 299-304.
13. Cox-Singh, J.; Davis, T. M.; Lee, K. S.; Shamsul, S. S.; Matusop, A.; Ratnam, S.; Rahman, H. A.; Conway, D. J.; Singh, B. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. Clin Infect Dis 2008, 46, 165-171.
14. Daneshvar, C.; Davis, T. M.; Cox-Singh, J.; Rafa'ee, M. Z.; Zakaria, S. K.; Divis, P. C.; Singh, B. Clinical and Laboratory Features of Human *Plasmodium knowlesi* Infection. Clin Infect Dis 2009, 49, 852-860.
15. Daneshvar, C.; Davis, T. M.; Cox-Singh, J.; Rafa'ee, M. Z.; Zakaria, S. K.; Divis, P. C.; Singh, B. Clinical and Parasitological Response to Oral Chloroquine and Primaquine in Uncomplicated Human *Plasmodium knowlesi* Infections. Malar. J 2010, 9, 238.
16. Fabre, R.; Berry, A.; Morassin, B.; Magnaval, J. F. Comparative Assessment of Conventional PCR With Multiplex Real-Time PCR Using SYBR Green I Detection for the Molecular Diagnosis of Imported Malaria. Parasitology 2004, 128, 15-21.
17. Fong, Y. L.; Cadigan, F. C.; COATNEY, G. R. A Presumptive Case of Naturally Occurring *Plasmodium knowlesi* Malaria in Man in Malaysia. Trans. R Soc Trop Med Hyg. 1971, 65, 839-840.
18. Gama, B. E.; Silva-Pires, F. E.; Lopes, M. N.; Cardoso, M. A.; Britto, C.; Torres, K. L.; de Mendonca, L. L.; de Souza, J. M.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Ferreira-da-Cruz, M. F. Real-Time PCR Versus Conventional PCR for Malaria Parasite Detection in Low-Grade Parasitemia. Exp. Parasitol 2007, 116, 427-432.
19. Hermesen, C. C.; Telgt, D. S.; Linders, E. H.; van de Locht, L. A.; Eling, W. M.; Mensink, E. J.; Sauerwein, R. W. Detection of *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites in Vivo by Real-Time Quantitative PCR. Mol. Biochem. Parasitol 2001, 118, 247-251.
20. Hoosen, A.; Shaw, M. T. Plasmodium Knowlesi in a Traveller Returning to New Zealand. Travel. Med Infect Dis 2011, 9, 144-148.
21. Jongwutiwes, S.; Buppan, P.; Kosuvin, R.; Seethamchai, S.; Pattanawong, U.; Sirichaisinthop, J.; Putapornpit, C. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans and Macaques, Thailand. Emerg. Infect Dis 2011, 17, 1799-1806.
22. Khim, N.; Siv, S.; Kim, S.; Mueller, T.; Fleischmann, E.; Singh, B.; Divis, P. C.; Steenkeste, N.; Duval, L.; Bouchier, C.; Duong, S.; Arie, F.; Menard, D. Plasmodium Knowlesi Infection in Humans, Cambodia, 2007-2010. Emerg. Infect Dis 2011, 17, 1900-1902.
23. Lee, K. S.; Cox-Singh, J.; Singh, B. Morphological Features and Differential Counts of *Plasmodium knowlesi* Parasites in Naturally Acquired Human Infections. Malar. J 2009, 8, 73.
24. Link, L.; Bart, A.; Verhaar, N.; van Gool, T.; Pronk, M.; Scharnhorst, V. Molecular Detection of *Plasmodium knowlesi* in a Dutch Traveler by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2012, 50, 2523-2524.
25. Lucchi, N. W.; Poorak, M.; Oberstaller, J.; DeBarry, J.; Srinivasamoorthy, G.; Goldman, I.; Xayavong, M.; da Silva, A. J.; Peterson, D. S.; Barnwell, J. W.; Kissinger, J.; Udhayakumar, V. A New Single-

- Step PCR Assay for the Detection of the Zoonotic Malaria Parasite *Plasmodium knowlesi*. PLoS. One. 2012, 7, e31848.
26. Luchavez, J.; Espino, F.; Curameng, P.; Espina, R.; Bell, D.; Chiodini, P.; Nolder, D.; Sutherland, C.; Lee, K. S.; Singh, B. Human Infections With *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. Emerg. Infect Dis 2008, 14, 811-813.
  27. Machado-Alba, J. E. Malaria by Plasmodium Knowlesi, A Zoonosis Transmitted by Vectors. Recent Pat Antiinfect. Drug Discov. 2015, 10, 8-9.
  28. Mangold, K. A.; Manson, R. U.; Koay, E. S.; Stephens, L.; Regner, M.; Thomson, R. B., Jr.; Peterson, L. R.; Kaul, K. L. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium spp.* J Clin Microbiol 2005, 43, 2435-2440.
  29. Moody, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. Clin Microbiol Rev 2002, 15, 66-78.
  30. Morassin, B.; Fabre, R.; Berry, A.; Magnaval, J. F. One Year's Experience With the Polymerase Chain Reaction As a Routine Method for the Diagnosis of Imported Malaria. Am J Trop Med Hyg. 2002, 66, 503-508.
  31. Muhamad, P.; Chaijaroenkul, W.; Congpuong, K.; Na-Bangchang, K. SYBR Green I and Taqman Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods for the Determination of Amplification of *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance-1 Gene (PFMDR1). J Parasitol 2011, 97, 939-942.
  32. Muller, M.; Schlagenhauf, P. *Plasmodium knowlesi* in Travellers, Update 2013. Int J Infect Dis 2014.
  33. Munoz, J.; Rojo-Marcos, G.; Ramirez-Olivencia, G.; Salas-Coronas, J.; Trevino, B.; Perez Arellano, J. L.; Torrus, D.; Munoz Vilches, M. J.; Ramos, J. M.; Alegria, I.; Lopez-Velez, R.; Aldasoro, E.; Perez-Molina, J. A.; Rubio, J. M.; Bassat, Q. [Diagnosis and Treatment of Imported Malaria in Spain: Recommendations From the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI)]. Enferm. Infecc. Microbiol Clin 2015, 33, e1-e13.
  34. Ng, O. T.; Ooi, E. E.; Lee, C. C.; Lee, P. J.; Ng, L. C.; Pei, S. W.; Tu, T. M.; Loh, J. P.; Leo, Y. S. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore. Emerg. Infect Dis 2008, 14, 814-816.
  35. Oddoux, O.; Debourgogne, A.; Kantele, A.; Kocken, C. H.; Jokiranta, T. S.; Vedy, S.; Puyhardy, J. M.; Machouart, M. Identification of the Five Human *Plasmodium* Species Including *P. knowlesi* by Real-Time Polymerase Chain Reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011, 30, 597-601.
  36. Ohrt, C.; O'Meara, W. P.; Remich, S.; McEvoy, P.; Ogutu, B.; Mtalib, R.; Odera, J. S. Pilot Assessment of the Sensitivity of the Malaria Thin Film. Malar. J 2008, 7, 22.
  37. Perandin, F.; Manca, N.; Calderaro, A.; Piccolo, G.; Galati, L.; Ricci, L.; Medici, M. C.; Arcangeletti, M. C.; Snounou, G.; Dettori, G.; Chezzi, C. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. J Clin Microbiol 2004, 42, 1214-1219.
  38. Rougemont, M.; Van Saanen, M.; Sahli, R.; Hinrikson, H. P.; Bille, J.; Jaton, K. Detection of Four Plasmodium Species in Blood From Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. J Clin Microbiol 2004, 42, 5636-5643.
  39. Rubio, J. M.; Benito, A.; Roche, J.; Berzosa, P. J.; Garcia, M. L.; Mico, M.; Edu, M.; Alvar, J. Semi-Nested, Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Human Malaria Parasites and Evidence of *Plasmodium vivax* Infection in Equatorial Guinea. Am J Trop Med Hyg. 1999, 60, 183-187.
  40. Rubio, J. M.; Post, R. J.; van Leeuwen, W. M.; Henry, M. C.; Lindergard, G.; Hommel, M. Alternative Polymerase Chain Reaction Method to Identify *Plasmodium* Species in Human Blood Samples: the Semi-Nested Multiplex Malaria PCR (SnM-PCR). Trans. R Soc Trop Med Hyg. 2002, 96 Suppl 1, S199-S204.
  41. Runsewe-Abiodun, I. T.; Efunshile, M.; Ghebremedhin, B.; Sotimehin, A. S.; Ajewole, J.; Akinleye, J.; Konig, B.; Konig, W. Malaria Diagnostics: a Comparative Study of Blood Microscopy, a Rapid Diagnostic Test and Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Malaria. J Trop Pediatr 2012, 58, 163-164.
  42. Seilmaier, M.; Hartmann, W.; Beissner, M.; Fenzl, T.; Haller, C.; Guggemos, W.; Hesse, J.; Harle, A.; Bretzel, G.; Sack, S.; Wendtner, C.; Loscher, T.; Berens-Riha, N. Severe *Plasmodium knowlesi* Infection With Multi-Organ Failure Imported to Germany From Thailand/Myanmar. Malar. J 2014, 13, 422.
  43. Singh, B.; Kim, S. L.; Matusop, A.; Radhakrishnan, A.; Shamsul, S. S.; Cox-Singh, J.; Thomas, A.; Conway, D. J. A Large Focus of Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Infections in Human Beings. Lancet 2004, 363, 1017-1024.
  44. Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X. P.; Jarra, W.; Pinheiro, L.; do, R., V.; Thaithong, S.; Brown, K. N. High Sensitivity of Detection of Human Malaria Parasites by the Use of Nested Polymerase Chain Reaction. Mol. Biochem. Parasitol 1993, 61, 315-320.
  45. Sulistyaningsih, E.; Fitri, L. E.; Loscher, T.; Berens-Riha, N. Diagnostic Difficulties With *Plasmodium knowlesi* Infection in Humans. Emerg. Infect Dis 2010, 16, 1033-1034.
  46. Ta, T. T.; Salas, A.; Ali-Tammam, M.; Martinez, M. C.; Lanza, M.; Arroyo, E.; Rubio, J. M. First Case of Detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a Traveller From Southeast Asia. Malar. J 2010, 9, 219.
  47. Van den, E. P.; Van, H. N.; Van Overmeir, C.; Vythilingam, I.; Duc, T. N.; Hung, I., X.; Manh, H. N.; Anne, J.; D'Alessandro, U.; Erhart, A. Human *Plasmodium knowlesi* Infections in Young Children in Central Vietnam. Malar. J 2009, 8, 249.

"

48. Vinetz, J. M.; Gilman, R. H. Asymptomatic *Plasmodium* Parasitemia and the Ecology of Malaria Transmission. Am J Trop Med Hyg. 2002, 66, 639-640.
49. Weiss, J. B. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. Clin Microbiol Rev 1995, 8, 113-130.
50. Wilairatanal, P.; Krudsood, S.; Tangpukdee, N. Management of *Plasmodium knowlesi* Malaria Without PCR Confirmation. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010, 41, 19-21.
51. William, T.; Menon, J.; Rajahram, G.; Chan, L.; Ma, G.; Donaldson, S.; Khoo, S.; Frederick, C.; Jelip, J.; Anstey, N. M.; Yeo, T. W. Severe *Plasmodium knowlesi* Malaria in a Tertiary Care Hospital, Sabah, Malaysia. Emerg. Infect Dis 2011, 17, 1248-1255.

"

"

Tabla 1: Cebadores y sondas de la Malaria RT-PCR con sus características principales.

Nombre	Secuencia	Especificidad	Canal de lectura (nm)	T <sup>a</sup> (°C)	[μM]
PLF*	AGTGTGTATCAATCGAGTTTC	Plasmodios	-----	55,7	1
REV	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal	-----	58,7	1
NewPLF 2S3	Cy5-TCGATTCCGGAGAGGGAGC-BHQ2	Plasmodios	Rojo (625-660)	68,9	0,1
FAL forwC	TxRd-CTATTCTAGGGGAAGTATTTTAGCTTTTCGC-BHQ2	<i>P. falciparum</i>	Naranja (585-610)	67,5	0,3
VIV 2Fc	Cy5.5-TCTTTGCTTCGGCTTGGAAGTC-BHQ2	<i>P. vivax</i>	Crimson (680-710)	68,5	0,1

\*Tamaño dependiendo de la especie de *Plasmodium*: *P. malariae* 821 pb, *P. falciparum* 787 pb, *P. vivax* 783 pb *P. ovale* 794 pb, *P. knowlesi* 807 pb, *P. cynomolgi* 785 pb.

Tabla 2: Tabla de contingencia 2x2 Nested-Multiplex Malaria PCR vs Malaria RT-qPCR

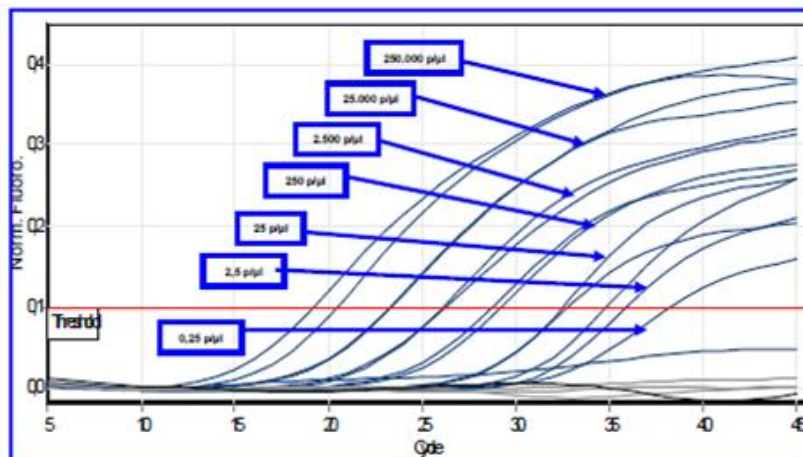
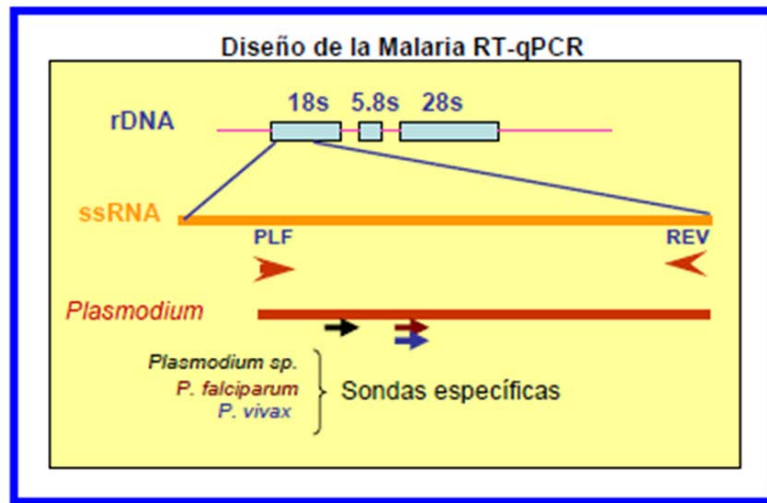
Nested-Multiplex Malaria PCR (102P/331N)	Malaria T-qPCR (106P/327N)			
		P	N	Total
	P	100 (23,09%)	2 (0,46%)	102
	N	6 (1,36%)	325 (75,06%)	331
	Total	106	327	433

P: positivo; N: negativo

Tabla 3: tabla comparativa de sondas de hibridación de Malaria RT-qPCR vs Nested-Multiplex Malaria PCR.

Nested-Multiplex Malaria PCR (102P/331N)	RT-PCR (106P/327N)					TOTAL
	Sonda <i>P. falciparum</i>		Sonda <i>P. vivax</i>	Sonda <i>Plasmodium sp</i>	N	
	F	63		73	1	
	M			10		
	O	1		11		
	V		6	6	1	
	N			6	325	
	TOTAL	64/74	6/7	106/102	327	433

F: *P. falciparum*; M: *P. malariae*; O: *P. ovale*; V: *P. vivax*; N: negativo



"

**Leyenda Figura 1**

Para el diseño de la Malaria RT-qPCR se usó como diana de amplificación el 18S rADN y como sistemas de detección el SYBR® Green I (inespecífico) y tres sondas Taqman (específicos): NewPLF 2S3 (*Plasmodium spp.*), FAL forwC (*P. falciparum*) y VIV 2Fc (*P. vivax*).

**Leyenda Figura 2**

Para la cuantificación de las muestras se ha realizado una curva patrón partiendo de una muestra con 250.000 parásitos/μl (aproximadamente 5%), haciendo diluciones seriadas la Malaria RT-qPCR es capaz de detectar hasta < 1 parásito/μl (< 0,0002%)

"  
"  
"  
"  
"  
"  
"  
"



#### **IV.2. - First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia**

**Thuy-Huong Ta Tang<sup>1</sup>**, Ana Salas<sup>2</sup>, Marwa Ali-Tammam<sup>1</sup>, María del Carmen Martínez<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Eduardo Arroyo<sup>3</sup> and Jose Miguel Rubio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Servicio de Enfermedades infecciosas. Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética Forense y Genética de Población, Departamento de Legislación Sanitaria y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

Publicado en: ***Malaria Journal* 2010, 9:219 doi:10.1186/1475-2875-9-219**



## RESUMEN

Anteriormente, *Plasmodium knowlesi* no se consideraba como una especie de *Plasmodium* que pudiera causar malaria en los seres humanos, ya que es un parásito de macacos de cola larga (*Macaca fascicularis*) y de cola corta (*Macaca nemestrina*) los cuales se encuentran en el sudeste de Asia.

Se describe el primer caso de infección por *P. knowlesi* en un viajero español, que volvió a España con fiebre diaria después de su último viaje de seis meses de vacaciones al extranjero a áreas boscosas del sudeste asiático entre 2008 y 2009. La infección por *P. knowlesi* fue detectado por PCR cuantitativa a tiempo real y confirmado por secuenciación del fragmento amplificado. Usando la Nested-Malaria multiplex PCR (método de referencia en España) y una prueba de diagnóstico rápido, la infección por *P. knowlesi* fue negativa. Este paciente ya estaba dado de alta y asintomático cuando se informó del resultado positivo a *P. knowlesi*.

Anterior a este caso hubo dos más de viajeros europeos con malaria causada por *P. knowlesi*, un hombre finlandés que viajó a la península de Malasia durante cuatro semanas en marzo del 2007, y un hombre sueco que hizo una breve visita a Malasia Borneo en octubre del 2006. En total, junto con este caso de infección por *P. knowlesi* en el viajero español que regresa del sudeste de Asia, son tres casos de infección por *P. knowlesi* en Europa, lo que indica que este plasmodio de simios puede infectar a los visitantes a zonas endémicas del Sudeste Asiático.

Este último caso europeo es bastante sorprendente, dado que se trata de un caso sintomático-no tratado por *P. knowlesi* en humanos, a diferencia de lo que se sabe actualmente sobre la infección por *P. knowlesi*. La mayoría de los casos anteriores eran en adultos, a menudo con síntomas y parasitemias relativamente altas hasta que en el 2009 salió un artículo sobre la provincia de Ninh Thuan, situada en la parte sur del centro de Vietnam, habitada principalmente por la minoría étnica Ra-Glai, donde relataba infecciones por *P. knowlesi* asintomático y co-infectados con *P. malariae*, con parasitemias bajas y dos de tres casos identificados eran niños muy pequeños menores de cinco años de edad.

CASE REPORT

Open Access

# First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia

Thuy-Huong Ta Tang<sup>1</sup>, Ana Salas<sup>2</sup>, Marwa Ali-Tammam<sup>1</sup>, María del Carmen Martínez<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Eduardo Arroyo<sup>3</sup>, Jose Miguel Rubio<sup>1\*</sup>

## Abstract

Previously, *Plasmodium knowlesi* was not considered as a species of *Plasmodium* that could cause malaria in human beings, as it is parasite of long-tailed (*Macaca fascicularis*) and pig-tailed (*Macaca nemestrina*) macaques found in Southeast Asia. A case of infection by *P. knowlesi* is described in a Spanish traveller, who came back to Spain with daily fever after his last overseas travel, which was a six-month holiday in forested areas of Southeast Asia between 2008 and 2009. His *P. knowlesi* infection was detected by multiplex Real time quantitative PCR and confirmed by sequencing the amplified fragment. Using nested multiplex malaria PCR (reference method in Spain) and a rapid diagnostic test, the *P. knowlesi* infection was negative. This patient was discharged and asymptomatic when the positive result to *P. knowlesi* was reported. Prior to this case, there have been two more reports of European travellers with malaria caused by *P. knowlesi*, a Finnish man who travelled to Peninsular Malaysia during four weeks in March 2007, and a Swedish man who did a short visit to Malaysian Borneo in October 2006. Taken together with this report of *P. knowlesi* infection in a Spanish traveller returning from Southeast Asia, this is the third case of *P. knowlesi* infection in Europe, indicating that this simian parasite can infect visitors to endemic areas in Southeast Asia. This last European case is quite surprising, given that it is an untreated-symptomatic *P. knowlesi* in human, in contrast to what is currently known about *P. knowlesi* infection. Most previous reports of human *P. knowlesi* malaria infections were in adults, often with symptoms and relatively high parasite densities, up to the recent report in Ninh Thuan province, located in the southern part of central Vietnam, inhabited mainly by the Ra-glai ethnic minority, in which all *P. knowlesi* infections were asymptomatic, co-infected with *P. malariae*, with low parasite densities and two of the three identified cases were very young children under five years old.

## Background

Recent reports from Asia suggest the possibility that *Plasmodium knowlesi*, is emerging as an important zoonotic human pathogen [1]. The natural hosts of *P. knowlesi* are the long-tailed (*Macaca fascicularis*) and pig-tailed (*Macaca nemestrina*) macaques [2], commonly found in Southeast Asia. *Plasmodium knowlesi* has a quotidian (24 h) asexual blood cycle, the shortest among primate malarias and produces daily fever peaks in its hosts, causing severe malaria if not treated [3]. At present, *P. knowlesi* transmission is restricted to the

*Anopheles leucosphyrus* group of mosquitoes, which currently comprises 20 species [4]. The range of the *A. leucosphyrus* group overlaps with the long-tailed and pig-tailed macaques, and naturally acquired within this range. *Plasmodium knowlesi* was first described in 1931; in 1932 was experimentally shown to be infectious to humans [3]. The first natural infection in humans was reported in 1965 [5] in a man from the United States after a visit to Peninsular Malaysia. In 1971, there was a presumptive case in a man of Malaysia [6]. No other reports were published on naturally acquired *P. knowlesi* infections in humans until 2004 [3]. *Plasmodium knowlesi* infections in human are not exclusive to Malaysia, but can also appear in China [7], in Thailand [8], Philippines [9], Singapore [10] and Indonesian Borneo [11].

\* Correspondence: jmrubio@isciii.es

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

*Plasmodium knowlesi* can be misidentified on a blood smear as the morphology of the blood-stage forms share similarities with *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum*, such as “bands forms” attributed to *P. malariae*, and delicate ring forms as seen with *P. falciparum* infections [2,12]. Currently, PCR assay and molecular characterization are the most reliable methods for detecting and diagnosing *P. knowlesi* infection [13-15]. Rapid diagnostic tests kits may or may not recognize *P. knowlesi* because of their specificity [16,17]. The disease can be treated using already existing anti-malarial therapy such as mefloquine and chloroquine. This report describes the first case in Spain and the third in Europe of naturally acquired infection with *P. knowlesi* in a Spanish traveller while staying in South-east Asia. Diagnosis was confirmed by multiplex Real time quantitative PCR and subsequent sequencing of the real-time PCR fragment.

### Case presentation

In March 2009, a 39-year-old Spanish man presented to a hospital in Madrid (Spain) with a fifteen-day history of daily and evening fever spikes, temperature of up to 40°C, arthralgia, myalgia, low back pain, chills and malaise. The patient had recently returned from a six-month holiday in cities of Southeast Asia between 2008 and 2009: Bangkok (Thailand), Banda Aceh and Pulau Weh (Indonesia) for three months, Kuala Lumpur (Malaysia) and Hanoi (North of Vietnam), places where human malaria is endemic. He reported being in contact with simians and staying in rural areas. He did not remember being bitten by mosquitoes, however some of his fellow travellers suffered Dengue and malaria attacks. He began malaria prophylaxis with mefloquine but due to adverse effects he changed to Malarone®. He reported to have taken 80% prophylaxis. In view of the complaints of the patient, the physician decided to admit him on 31<sup>st</sup> March 2009. Physical examination showed a remarkable hepatomegaly and splenomegaly.

Laboratory investigations showed no anaemia (haemoglobin 12.7 g/dl, reference range 12-17), with normal erythrocyte count ( $4.46 \times 10^6$  /mm<sup>3</sup>, reference range 3.5-5.5), moderate leucopaenia ( $3.82 \times 10^3$  /mm<sup>3</sup>, reference range 4-10), thrombocytopenia (platelet count  $86 \times 10^3$  /mm<sup>3</sup>, reference range 115-450), and some liver function abnormalities (serum alanine aminotransferase 93 U/L, reference range 5-41; aspartate aminotransferase 43 U/L, reference range 4-38; gamma-glutamyltransferase 78 U/L, reference range 11-49; alkaline phosphatase 71 U/L, reference range 40-129; and total bilirubin 1.1 mg/dl, reference range 0.2-1.3).

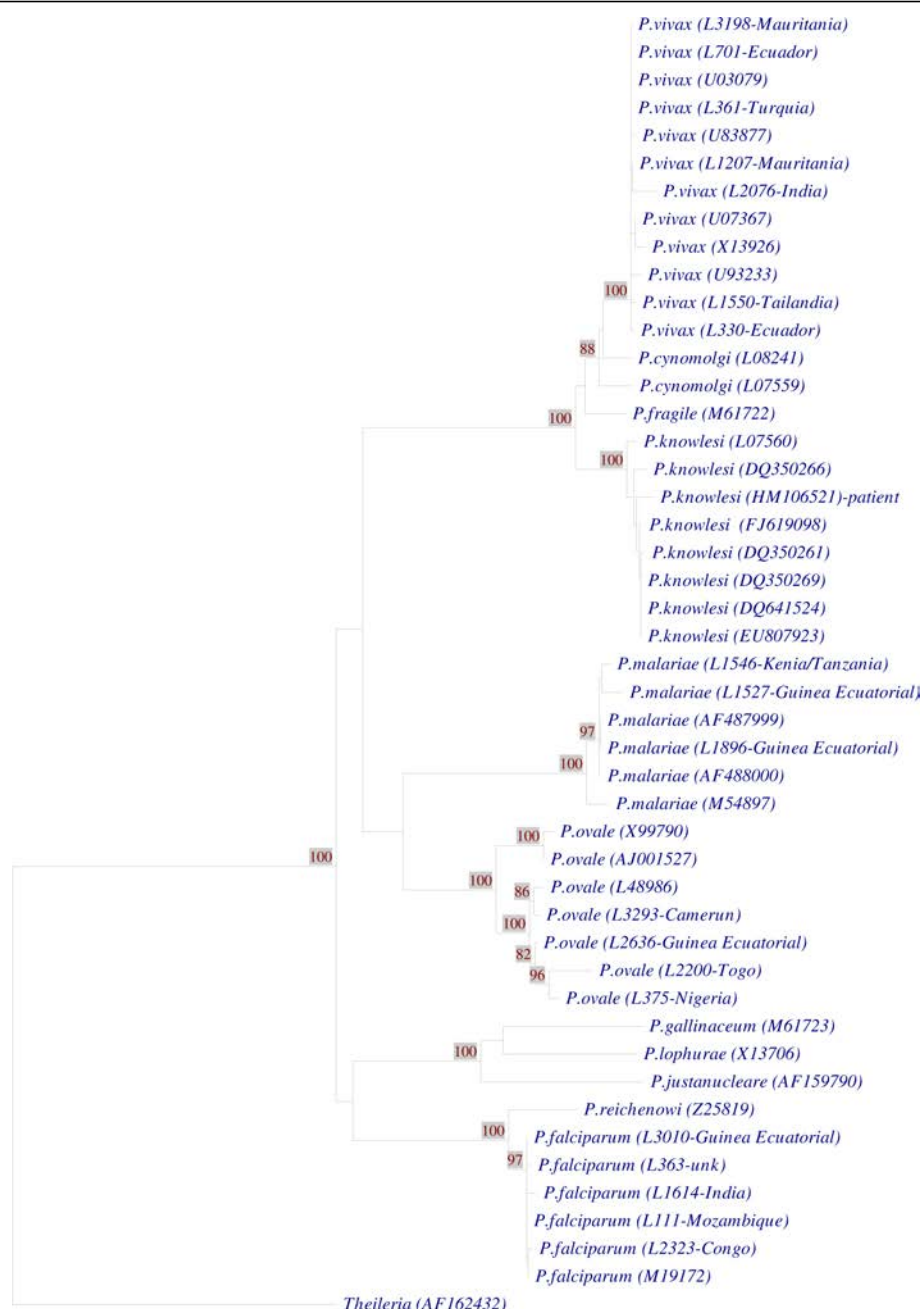
Urine analysis, blood sugar, blood urea nitrogen, and creatinine were normal. Renal function was normal. Patient's peripheral blood samples were forwarded to

the Diagnostic Reference Laboratory in Madrid to be tested to a possible bacterial, viral or parasitic infection. To control the patient's fever physicians gave intravenous paracetamol and hydration. Fever was of 38.5°C during the first week, restoring to normal in the second week temperature and analytic parameters. It was not necessary any kind of antibiotic to manage the clinical state of the patient.

Dengue, Q fever, rickettsiosis were ruled out with negative serology and reverse transcription-polymerase chain reaction. Likewise, one sample was sent to the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory (2<sup>nd</sup> April 2009). The patient DNA was extracted by automated extraction on the QIAcube™. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit. Qiagen. The result obtained with nested multiplex malaria PCR (polymerase chain reaction) [18] was negative for the four human *Plasmodium* species. This nested PCR only can detect and differentiates between the four human *Plasmodium* species.

Meanwhile, this laboratory was evaluating a DNA-based diagnostic method by real time PCR targeting the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) genes of all *Plasmodium* species (human and non-human). The patient's sample was positive for malaria DNA. The real-time PCR generated a PCR product which was positive for specific-*Plasmodium* probe. This assay include one set of genus-specific primers and one set of fluorescent energy transfer hybridization probes: a genus *Plasmodium*-specific probe, a *P. falciparum* species-specific probe and a third probe specific for *P. vivax*. The genus *Plasmodium*-specific probe hybridizes to amplicons from all four human and non-human *Plasmodium* species. Based on melting curve analysis, all *Plasmodium* are indistinguishable among them. In this real time PCR method positive and negative isolates are always included as positive and negative controls, respectively. The parasitaemia level calculated by the multiplex real time quantitative PCR on the basis of a standard curve performed on the ten-fold dilutions of infected blood sample (parasitaemia proportion was identified by microscopy and expressed as number of parasites per white blood cell in a thin blood film by examining over 100 fields and multiplied by 8,000 and as a percentage of erythrocytes) within uninfected erythrocytes from healthy individuals with known baseline erythrocyte counts, was approximately of 250 parasites/μl blood or equivalent to parasitaemia 0.003%.

The amplification product generated by multiplex real time quantitative PCR was sequenced and this sequence was compared with known *Plasmodium* SSU rRNA sequences and the sequence of the clinical isolate strongly coincided with *P. knowlesi* SSU rRNA sequences transcribed during asexual stages (Figure 1). This sequence of 812 bp has been submitted to the

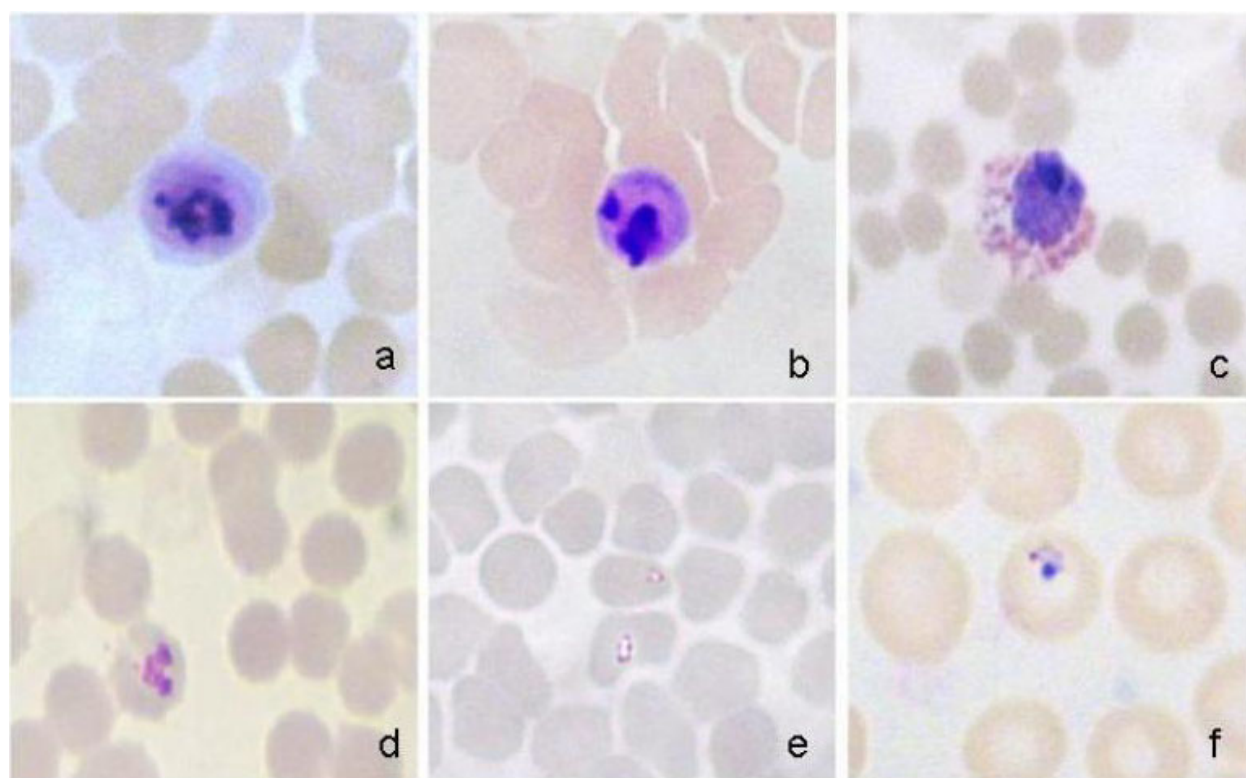


**Figure 1** Phylogenetic tree comparing our Spanish case (GenBank accession number HM106521) with other *Plasmodium* species identified in our laboratory as well, but not submitted to the GenBank (identified as "L plus a internal number" given in our Malaria Laboratory followed of the country name in the cases where this is known) and with known *Plasmodium* A-type SSU rRNA sequences from GenBank (accession numbers are indicated in parenthesis). The sequence of our patient clusters with all other *P. knowlesi* strains.

GenBank data base with the following accession number HM106521.

After this amazing finding in this sample, a thorough analysis was performed on it. In a rapid diagnostic test for malaria (Binax Now Malaria Test; Binax, Inc., USA), the sample was both negative for *P. falciparum* histidine-rich protein 2 and for pan-malarial aldolase

antigen, suggesting a non-*Plasmodium* infection. Retrospective examination of Giemsa-stained thin blood films showed infected erythrocytes with an inconclusive morphologic appearance. The parasite structure found inside the erythrocytes was compatible with *Plasmodium* which suggested a possible infection by *Plasmodium*, in agreement with multiplex Real time quantitative PCR



**Figure 2 Giemsa-stained thin blood films of the Spanish traveller infected with multiplex Real Time quantitative PCR-confirmed *Plasmodium knowlesi*.** By microscopy, inside the infected erythrocytes, structures compatible with *Plasmodium* can be appreciated. a-b: mature trophozoites; c: gametocyte; d: indefinite stage; e-f: early trophozoites.

results (Figure 2). The serodiagnosis of malaria caused by *P. falciparum* was negative (Falciparum-Spot IF, Bio-mérieux S.A., France).

The patient was already discharged since 13<sup>th</sup> April 2009 when this positive result to *P. knowlesi* was reported by early May (6<sup>th</sup> May 2009). The patient was contacted in June (due to this patient is very fond of travelling, his whereabouts was hard to determine) for a new consultation and treated with chloroquine despite being asymptomatic. A month later, in the follow-up visit he continued being well. Previous to the treatment, a blood sample was taken again and this time was only sent to the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory (16<sup>th</sup> June 2009). The second blood sample was both negative by microscopy and by real time PCR (results given 24<sup>th</sup> June 2009). This shows that there was a conflicting result between the first and the second blood sample. In order to rule out any possible error in the handling and/or identification of the samples belonging to this patient, an Individual Genome Mapping was done by Genetic Forensic and Population Genetic Laboratory. Both samples were typed through AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA) for 15 autosomal STRs ("short

tandem repeats"), widely used in the forensic and identification field. Protocol was performed according to manufacturer instructions. The analysis of the fragments was performed in ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer. Both samples yielded identical STRs profiles, and were consequently considered from the same individual origin.

The large focus of human infection with *P. knowlesi* has been reported in Sarawak, Malaysia Borneo and later in several countries of Southeast Asia [7-11], as well as in US, Finnish and Sweden travellers [1,19,20] and together with this present report, this indicates that humans are indeed susceptible to infection by simian parasites. Travellers can spread new and re-emerging infectious diseases that initially appear in developing countries, and they act as ideal sentinels for the early detection of these diseases [21]. This is the first report of human *P. knowlesi* infection in Spain, with very unusual characteristics, given that most previously reported cases were symptomatic (between mild and severe infection) and treated with anti-malarial drugs. Even though there are very few asymptomatic cases of *P. knowlesi* human infection [22], this monkey malaria may be less severe among humans than was previously thought. This does not discard that specific PCR primers for

*P. knowlesi* should be included to provide valuable diagnostic information [3], and laboratory clinicians and physicians should become more aware of this disease. Recently published reports indicate that the primers described by Singh *et al* [3] have the possibility of cross-hybridization with *P. vivax* [22,23].

The reason why our patient did not receive any anti-malarial treatment even though he had some symptoms compatible with malaria disease such as daily fever, thrombocytopaenia, hepatomegaly and splenomegaly, and he was clinically well in the second consultation without anti-malarial therapy cannot be explained. There is a possibility that residual prophylactic drug levels may have helped control the parasitaemia and severity of symptoms in this patient before hospital admission. A cross-contamination was dismissed from the beginning because in Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory had never worked before with *P. knowlesi* DNA and this case showed an unexpected parasite species.

## Conclusion

*Plasmodium knowlesi* infection is normally considered as a parasite of macaques, humans who work at the forest fringe or enter the rainforest to work are at risk of infection [24]. Clearly, blood-smear diagnosis alone is inadequate to confirm whether a patient has *P. malariae* or *P. knowlesi* infection. Clinical and Diagnostic Reference Laboratories should now include the capacity to detect *P. knowlesi* in their validated PCR-based tests for malaria, as current laboratory methods for species differentiation target only the four human plasmodia species [25]. Clinics in the West should be aware of *P. knowlesi* as a possible cause of human malaria. The prevalence of naturally acquired primate malaria in human may be underestimated [26].

The multiplex Real time quantitative PCR and subsequent sequencing the PCR fragment confirmed that the patient had *P. knowlesi* parasite. Apparently the patient had the infection by *P. knowlesi* but he developed an uncomplicated knowlesi malaria disease and he improved without receiving treatment for malaria. It might the prophylaxis with Malarone® was effective against erythrocytic stage, but that does not avoid the infection. Most of the parasite forms seen on the blood film were gametocytic stage (this form does not produce symptoms in human and it can remain more time in blood). This case is uncommon, but is not the only, as there are three more atypical human *P. knowlesi* infections reported from central Vietnam [22]. Low parasitaemia in this patient (250 parasites/μl blood or equivalent to parasitaemia 0.003%) may have caused the lack of reactivity with the pan-malarial aldolase antigen; low parasitaemia will not be detected although a

negative test result does not exclude a *P. knowlesi* infection [17]. However, parasites have been identified by microscopy in spite of low parasitaemia because a positive result was expected and many hours were spent to detect it [27].

Although very little is known about *P. knowlesi* infection, for the time being, out of Southeast Asia, it would be suitable or advisable to design specific *P. knowlesi* primers or to include them in the current validated PCR-based tests from Reference Laboratories.

## Consent

Oral informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images after explanation of the report objectives.

## Acknowledgements

We express our special thanks to the patient for allowing us to publish his case. We also gratefully acknowledge Luz García García for help on figures. The research of THT is supported by a project grant from the Sanitary Research Funds, Instituto de Salud Carlos III (number CM07/00006). This study was financed by Spanish Ministry of Science & Innovation PET2007\_217.

## Author details

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Infectious Diseases Department, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Genetic Forensic and Population Genetic Laboratory, Toxicology and Sanitary Legislation Department, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

## Authors' contributions

THT, JMR, AS and EA wrote the paper, AS and MDCM were the physicians responsible for the patient, JMR supervised molecular characterization of parasite, conceived the study, its design and coordination, analyzed the phylogenetic tree of SSU rRNA sequences and corrected the manuscript, THT carried out the multiplex real time quantitative PCR, analysed the sequence alignment and drafted the manuscript, EA was responsible for Individual Genome Mapping, ML performed the patient DNA isolation, archive blood sample, stained and examined the slides by microscopy, MAT participated in the sequence alignment. All authors have read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 May 2010 Accepted: 27 July 2010 Published: 27 July 2010

## References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): **Simian malaria in a U.S. traveler—New York, 2008.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, **58**:229-232.
- Cox-Singh J, Singh B: **Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?** *Trends Parasitol* 2008, **24**:406-410.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** *Lancet* 2004, **363**:1017-1024.
- Sallum MA, Peyton EL, Wilkerson RC: **Six new species of the Anopheles leucosphyrus group, reinterpretation of *An. elegans* and vector implications.** *Med Vet Entomol* 2005, **19**:158-199.
- Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR: **A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys.** *Science* 1965, **149**:865.



6. Fong YL, Cadigan FC, Coatney GR: **A presumptive case of naturally occurring *Plasmodium knowlesi* malaria in man in Malaysia.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971, **65**:839-840.
7. Zhu HM, Li J, Zheng H: [Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006, **24**:70-71, Chinese.
8. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H: **Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2211-2213.
9. Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, Nolder D, Sutherland C, Lee KS, Singh B: **Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:811-813.
10. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW, Tu TM, Loh JP, Leo YS: **Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:814-816.
11. Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, Cheng Q, Hudson BJ: ***Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:672-674.
12. Coatney GR: **The simian malaras: zoonoses, anthroponoses, or both?** *Am J Trop Med Hyg* 1971, **20**:795-803.
13. Babady NE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Pritt BS: **Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:516-518.
14. Safeukui I, Millet P, Boucher S, Melinard L, Fregeville F, Receveur MC, Pistone T, Fialon P, Vincendeau P, Fleury H, Malvy D: **Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants.** *Malar J* 2008, **7**:70.
15. Zheng H, Zhu HM, Ning BF, Li XY: [Molecular identification of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection in a human case]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006, **24**:273-276.
16. Kawai S, Hirai M, Haruki K, Tanabe K, Chigusa Y: **Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections.** *Parasitol Int* 2009, **58**:300-302.
17. Van Hellemond JJ, Rutten M, Koelwijin R, Zeeman AM, Verweij JJ, Wismans PJ, Kocken CH, van Genderen PJ: **Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:1478-1480.
18. Rubio JM, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergerd G, Hommel M: **Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR).** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**:199-204.
19. Kantele A, Marti H, Felger I, Müller D, Jokiranta TS: **Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1434-1436.
20. Bronner U, Divis PC, Färnert A, Singh B: **Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo.** *Malar J* 2009, **8**:15.
21. Marano C, Freedman DO: **Global health surveillance and travelers' health.** *Curr Opin Infect Dis* 2009, **22**:423-429, Review.
22. Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, Hungle X, Manh HN, Anné J, D'Alessandro U, Erhart A: **Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam.** *Malar J* 2009, **8**:249.
23. Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day NP, White NJ, Snounou G: **Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**:4173-4175.
24. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B: **Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**:852-860.
25. Lee KS, Cox-Singh J, Brooke G, Matusop A, Singh B: ***Plasmodium knowlesi* from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo.** *Int J Parasitol* 2009, **39**:1125-1128.
26. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B: **Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections.** *Malar J* 2009, **8**:73.
27. Moody A: **Rapid diagnostic tests for malaria parasites.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:66-78.

doi:10.1186/1475-2875-9-219

**Cite this article as:** Tang et al.: First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria Journal* 2010 **9**:219.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



**IV.3. - First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi***

**Thuy H Ta<sup>1</sup>**, Shamilah Hisam<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Adela I Jiram<sup>2</sup>, NorParina Ismail<sup>2</sup> and José M Rubio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Parasitology Unit, Institut Penyelidikan Perubatan, Institute for Medical Research, 50588 Jalan Pahang, Kuala Lumpur, Malaysia.

Publicado en: ***Malaria Journal* 2014 13:68. doi:10.1186/1475-2875-13-68**



## RESUMEN

Desde 1960, un total de siete especies de malaria de monos han sido reportados como transmisibles al hombre por la picadura mosquitos: *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium eylesi*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium Inui*, *Plasmodium Schwetzi* y *Plasmodium simium*. Con la excepción de *P. knowlesi*, ninguna de las otras especies ha sido capaz de infectar a los humanos de forma natural. En este trabajo se describe el primer caso de malaria por *P. cynomolgi* en humano adquirido de forma natural en los seres humanos.

La paciente era una mujer de 39 años de edad, residente en una zona libre de malaria, sin antecedentes de malaria o de viajes a zona endémica de malaria. Inicialmente, la malaria se diagnosticó y se identificó como *Plasmodium malariae* / *P. knowlesi* por microscopía en el Departamento de Salud del Estado Terengganu. Se realizó frotis sanguíneo y gota gruesa teñidos con Giemsa al 10% para examen microscópico. La identificación molecular de especies se realizó en el Instituto de Investigación Médica (IMR, Malasia) y en el Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes (MAPELAB, España) utilizando diferentes métodos de PCR anidada.

En IMR se realizó un nuevo examen microscópico. Esta vez se observaron características morfológicas compatibles con *Plasmodium vivax* que fue confirmado por la PCR anidada desarrollada por Snounou y col. en el año 1993. Sin embargo, en MAPELAB se realizó un ensayo de PCR anidada diferente mas secuenciación y se confirmó que el paciente estaba infectado con *P. cynomolgi* y no con *P. vivax*.

Este es el primer caso reportado de infección por *P. cynomolgi* en humano adquirido de forma natural, pero puede haber más casos no diagnosticados o mal diagnosticados, ya que *P. cynomolgi* es morfológicamente indistinguible de *P. vivax*, y uno de los métodos de PCR más utilizados para la detección de la infección por malaria identifica una infección de *P. cynomolgi* como *P. vivax*.

Las especies de *Plasmodium* de simios pueden infectar a los seres humanos de forma rutinaria en el sudeste asiático. Los nuevos métodos de diagnóstico son necesarios para distinguir entre las especies de malaria humana y las de mono. Son necesarios adicionales estudios epidemiológicos, incluyendo estudios en el mosquito vector para conocer la relevancia de la malaria por *cynomolgi* y su implicación en la salud pública humana y en el control de la malaria humana.

La malaria zoonótica no puede ser ignorada visto el aumento de interacciones entre el hombre y los animales salvajes en el proceso de urbanización.



CASE REPORT

Open Access

# First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*

Thuy H Ta<sup>1</sup>, Shamilah Hisam<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Adela I Jiram<sup>2</sup>, NorParina Ismail<sup>2</sup> and José M Rubio<sup>1\*</sup>

## Abstract

Since 1960, a total of seven species of monkey malaria have been reported as transmissible to man by mosquito bite: *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium eylesi*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium inui*, *Plasmodium schwetzi* and *Plasmodium simium*. With the exception of *P. knowlesi*, none of the other species has been found to infect humans in nature. In this report, it is described the first known case of a naturally acquired *P. cynomolgi* malaria in humans.

The patient was a 39-year-old woman from a malaria-free area with no previous history of malaria or travel to endemic areas. Initially, malaria was diagnosed and identified as *Plasmodium malariae*/*P. knowlesi* by microscopy in the Terengganu State Health Department. Thick and thin blood films stained with 10% Giemsa were performed for microscopy examination. Molecular species identification was performed at the Institute for Medical Research (IMR, Malaysia) and in the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory (MAPELAB, Spain) using different nested PCR methods.

Microscopic re-examination in the IMR showed characteristics of *Plasmodium vivax* and was confirmed by a nested PCR assay developed by Snounou *et al.* Instead, a different PCR assay plus sequencing performed at the MAPELAB confirmed that the patient was infected with *P. cynomolgi* and not with *P. vivax*.

This is the first report of human *P. cynomolgi* infection acquired in a natural way, but there might be more undiagnosed or misdiagnosed cases, since *P. cynomolgi* is morphologically indistinguishable from *P. vivax*, and one of the most used PCR methods for malaria infection detection may identify a *P. cynomolgi* infection as *P. vivax*. Simian *Plasmodium* species may routinely infect humans in Southeast Asia. New diagnostic methods are necessary to distinguish between the human and monkey malaria species. Further epidemiological studies, incriminating also the mosquito vector(s), must be performed to know the relevance of cynomolgi malaria and its implication on human public health and in the control of human malaria.

The zoonotic malaria cannot be ignored in view of increasing interactions between man and wild animals in the process of urbanization.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, *Plasmodium cynomolgi*, Molecular methods, Malaysia, Simian malaria

## Background

It has been asked whether animal malaria could be considered as true zoonoses. It has been known for some time that malaria of some non-human primates may infect man [1]. The infectivity of the simian malaria parasites in humans through anopheline mosquitoes has been demonstrated experimentally [2,3], although natural transmission of a non-human *Plasmodium* species

to humans was, until recently, thought to be rare [4]. In 1965, the first case of a naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection was described [5], but it was not until 2004 when Singh *et al.* [6] identified 120 (57.7%) individuals with malaria as single or mixed *Plasmodium knowlesi* infections, that simian malaria started to be considered as a concern for human public health.

The absence of confirmed naturally acquired infections of other simian species of *Plasmodium* should not discourage consideration and investigation of them as zoonosis [7]. Since 1960, a total of seven species of monkey malaria have been reported as transmissible to man by mosquito

\* Correspondence: jmrubio@isciii.es

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Microbiology Centre, Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

bite: *Plasmodium cynomolgi* [8-10], *Plasmodium brasilianum* [11], *Plasmodium eylesi*, *Plasmodium knowlesi* [2,12], *Plasmodium inui* [13], *Plasmodium schwetzi* [14], and *Plasmodium simium* [15].

*Plasmodium cynomolgi*, *P. knowlesi*, *P. inui* and *P. eylesi* are distributed in Asia, *P. brasilianum* and *P. simium* in the New World, while *P. schwetzi* is found in Africa [1]. With the exception of *P. knowlesi*, none of the other species has been found to infect humans in nature.

Natural *P. knowlesi* infection may progress as a self-limiting malaria with spontaneous cure [12], although generally the presentation progresses as moderate or can be severe [4,16-19], requiring anti-malarial therapy [20-24]. The striking feature of induced cynomolgi malaria infections in man was the high degree of clinical manifestations observed in relation to the low level of parasitaemia [25]. Clinical symptoms consisted of cephalgia, anorexia, myalgia, and nausea, in that order. The symptoms were usually present only during febrile episodes, were of moderate severity, and easily controlled by simple medications. The most prominent physical findings were splenomegaly and hepatomegaly [25].

*Plasmodium cynomolgi* was first described by Mayer in 1907 in Germany in *Macaca cynomolgus* (= *Macaca fascicularis*) imported from Java [25]. The morphological features of *P. cynomolgi*, by microscopy, are almost identical to that of *Plasmodium vivax*. The host red blood cell enlarges as the trophozoite grows, accompanied by prominence of Schüffner's stippling and pigmentations in mature trophozoites. The cytoplasm becomes amoeboid and pigments in small granules with yellowish brown in colour are scattered throughout the cytoplasm. The asexual cycle is completed in 48 hours. The prepatent periods range from seven to 16 days with a mean of 9.8 days. Similarly to *P. vivax*, *P. cynomolgi* presents hypnozoites, which can initiate relapses [25].

In this report, the first known case of naturally acquired *P. cynomolgi* malaria in humans is described.

### Case presentation

The patient was a 39-year-old Malay woman from the east coast of Peninsular Malaysia (Hulu Terengganu) with no previous history of malaria and an uneventful medical history. She lives in a modern housing area and behind her house there is a small, forested area with occasional sightings of long-tailed macaques. She works as a government nurse in a malaria-free area.

She experienced episodes of mild to moderate 24-hour cycles of morning fevers since 10 January, 2011 with chills and rigor, cough and cold. Four days prior, she visited her mother's house, in a non-endemic malaria area (6-9 January, 2011) and did not travel to any other malaria-endemic areas. The symptoms were non-specific and mimicked a flu-like syndrome. She took two days of

medical leave (13, 14 January) without seeking hospital treatment. She felt more ill and was still febrile after two weeks and sought treatment at the Terengganu State Health Department. She was admitted to hospital on 20 January. A series of blood films for malaria parasites were taken and screened by microscopy and an initial diagnosis of *Plasmodium malariae*/*P. knowlesi* was concluded. The Giemsa-stained thick blood smears revealed 0.024% *Plasmodium* parasitaemia (1,200 parasites/ $\mu$ l) with only asexual stages. She was given a three-day course of oral chloroquine (day 1: 600 mg base and 300 mg base six hours later; day 2 and day 3: 300 mg base daily, in total 25 mg base/kg), according to the Malaysian National Antibiotic Guidelines on management of malaria. The patient recovered and was discharged one week later (26 January, 2011). Microscopic examinations of her blood smears were performed weekly for the first month from discharge followed by monthly examinations for one year. All blood smears were negative.

The Malaysian Vector Borne Disease Control Programme team did a case investigation among residents within the patient's housing area and surveyed the area for possible vectors. No other persons were infected and anopheline mosquitoes caught were negative for malaria parasites, as determined by mosquito dissection. In this area *Anopheles cracens* was the predominant mosquito which is the vector of *P. inui* and *P. cynomolgi* [26].

Patient blood samples were sent to the Institute for Medical Research (IMR, Kuala Lumpur, Malaysia) for further species confirmation by microscopy and molecular diagnostic methods. Microscopic re-examination of blood film showed characteristics of *P. vivax* rather than *P. malariae*/*P. knowlesi*, scanty trophozoites, larger than the size of *Plasmodium falciparum*, were visible in the "ghost" of red blood cells, with large chromatin dot and thick cytoplasm. Molecular species identification was performed by a nested PCR assay based on the small subunit (SSU) rRNA genes with primers specific for *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *Plasmodium ovale* (Snounou-PCR) [27] and primers specific for *P. knowlesi* (Singh-PCR) [6]. Molecular diagnosis by the Snounou-PCR assay identified a *P. vivax* infection yielding the expected size fragment using the specific-primer pair for *P. vivax*; while the rest of the species-specific nested PCR assays for *P. malariae*, *P. falciparum* and the Singh-PCR for *P. knowlesi* did not produce any amplifications.

A DNA sample was sent to the Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory (MAPELAB, CNM-ISCIIL, Madrid, Spain) as part of an informal quality control exchange. The sample was analysed by a modification of the nested multiplex malaria PCR (NM-PCR), also based on the small subunit (SSU) rRNA genes [28,29], adding a parallel nested PCR for *Plasmodium* genus amplification (NG-PCR). The NM-PCR method is able to identify

the four human malaria species (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae*) in two consecutive multiplexing amplifications, while the NG-PCR identifies all *Plasmodium* species. Primer sequences, concentration and annealing temperature to set up these methods are described in Table 1.

In the MAPELAB molecular diagnosis by NM-PCR was negative for the four human malaria species and positive for NG-PCR showing an amplified fragment of expected size, confirming that the patient indeed had malaria infection. Sequencing of amplified products, using PLF and UNR primers from the NM-PCR assay, were performed after DNA purification (Illustra DNA and Gel Band Purification Kit, General Electric Healthcare) by Cycle Sequencing using Big Dye Terminator v3.1 in an ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer. The sequence obtained has been submitted to the GenBank data base with the accession number JQ794445.

A BLAST search of the sequence of 785 nucleotides in GenBank showed highest similarity with *P. cynomolgi* sequences, 99.9% with *P. cynomolgi* Mulligan strain from Malaysia (Accession number AB287290), followed by similarities between 99.6 and 99.4% with three other *P. cynomolgi* SSU rRNA sequences transcribed during the asexual stages (Accession No AB287289, L07559 and L08241), thereby confirming that the patient was infected with *P. cynomolgi*. Furthermore, a phylogenetic tree was performed, with Treecon software [30], after ClustalW alignment of the sequences [31] by Neighbour joining method, comparing the A-type SSU rRNA sequence obtained from the patient with sixty sequences from twelve *Plasmodium* species. The phylogenetic tree shows that patient's sequence formed a monophyletic clade with *P. cynomolgi* independent of the clade formed

for *P. vivax* sequences, adding another evidence that patient was infected with *P. cynomolgi* (Figure 1). In Madrid's laboratory, no sample of *P. cynomolgi* had ever been present, so the result could not be caused by DNA contamination.

Morphologically, microscopic analysis of asexual stages of *P. cynomolgi* could be misidentified as *P. vivax*, because they are indistinguishable, and therefore, any infection in humans will be characterized as *P. vivax* [25]. In these cases, molecular diagnostic methods are the most accurate way to distinguish between species that are morphologically identical such as *P. knowlesi*/*P. malariae* or *P. vivax*/*P. cynomolgi* [4,5,11,25]. In this study, two different PCR methods gave discrepant results but sequencing showed an infection by *P. cynomolgi*.

NewPLFshort primer coupled to the specific *P. vivax* primer VIRsh in the NM-PCR did not show any amplification product as it was expected in a *P. cynomolgi* infection. In contrast, using the rVIV1 and rVIV2 primers, in the Snounou-PCR assay the patient sample was identified as *P. vivax* showing a possible cross amplification.

In the NM-PCR, NewPLFshort primer has 100% identity with *P. cynomolgi* in the corresponding region, since this primer is designed as a universal *Plasmodium* primer. Instead, VIRsh primer mismatches six nucleotides out of 15 (40%), including a gap and a double nucleotide insertion, in the corresponding region of the *P. cynomolgi* sequence (Figure 2). This primer has a melting temperature of 52.7°C and the PCR is performed at very stringent conditions of 53°C. On the other hand, comparing the Snounou primer sequence corresponding to rVIV1 primer with *P. cynomolgi* sequences, there is only one mismatch in the 30 nucleotides of the primer and the sequence of the rVIV2 primer shows seven mismatches out

**Table 1 Description of NM-PCR and NG-PCR with the corresponding primers sequences, concentration and annealing temperature**

Reaction	Primer name	Primer (μmol/L)	Sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)	Specificity
First PCR*	UNR	0.10	GACGGTATCTGATCGTCTTC	58°C		Universal
	PLF	0.10	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC		783–821§	<i>Plasmodium</i>
	HUF	0.01	GAGCCGCCTGGATACCGC		231	Human
NM-PCR†	NewPLFshort	0.15	CTATCAGCTTTTGATGTTAG	53°C		<i>Plasmodium</i>
	MARshort	0.10	TCCAATTGCCTTCTG		241	<i>P. malariae</i>
	FARshort	0.15	GTTCCCTAGAATAGTTACA		370	<i>P. falciparum</i>
	OVRshort	0.10	AGGAATGCAAAGARCAG		407	<i>P. ovale</i>
	VIRshort	0.10	AAGGACTTCCAAGCC		476	<i>P. vivax</i>
NG-PCR‡	NewPLFshort	0.50	CTATCAGCTTTTGATGTTAG	53°C	735–773¶	<i>Plasmodium</i>
	NewRevshort	0.50	CCTTAACCTTCGTTCTTG			<i>Plasmodium</i>

\*First PCR performed at final volume of 50 μl and 5 μl DNA template.

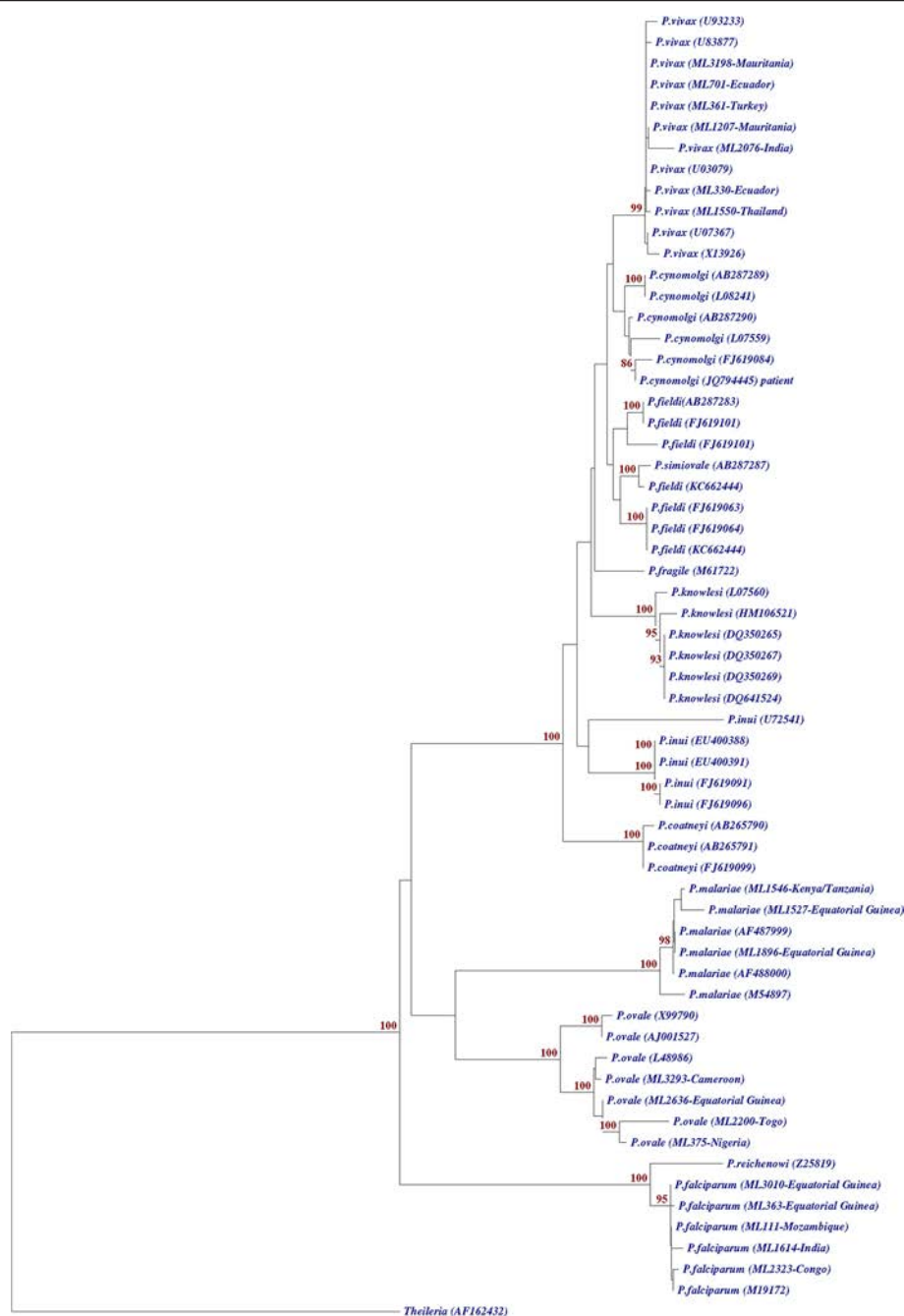
†Second multiplex PCR performed at final volume of 25 μl with 2 μl template from first PCR product.

‡Second genus PCR performed at final volume of 50 μl with 2 μl template from first PCR amplification.

§Size depending on *Plasmodium* species: *P. malariae* 821 bp, *P. falciparum* 787 bp, *P. vivax* 783 bp, *P. ovale* 794 bp, *P. knowlesi* 807 bp, *P. cynomolgi* 785 bp.

¶Size depending on *Plasmodium* species: *P. malariae* 773 bp, *P. falciparum* 739 bp, *P. vivax* 735 bp, *P. ovale* 746 bp, *P. knowlesi* 763 bp, *P. cynomolgi* 738 bp.

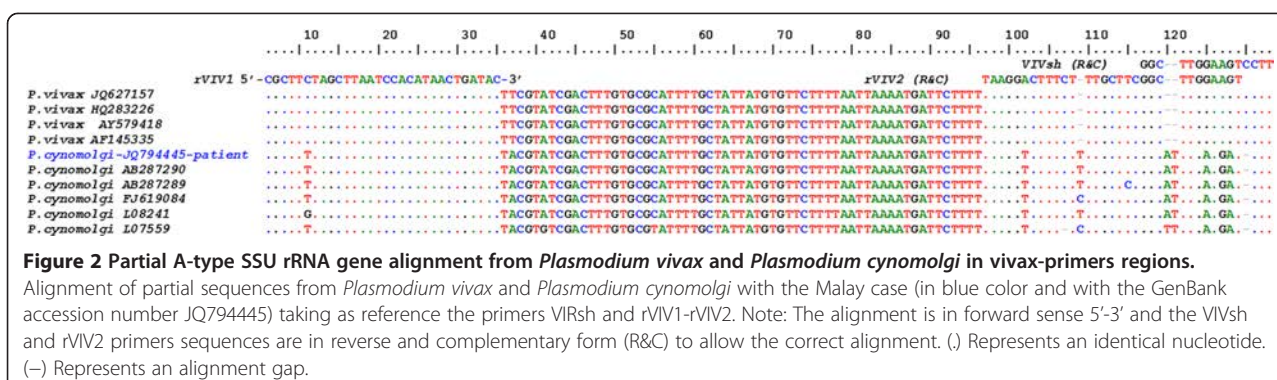




**Figure 1 Neighbour joining phylogenetic tree.** Phylogenetic tree comparing the A-type SSU rRNA gene sequence obtained (GenBank accession number JQ794445) with other *Plasmodium* species identified in our laboratory as well, but not submitted to the GenBank (identified as "ML plus an internal number" given in our Malaria Laboratory followed of the country name in the cases where this is known) and with known *Plasmodium* A-type SSU rRNA sequences from GenBank (accession numbers are indicated in parenthesis). The sequence of our patient clusters with all other *P. cynomolgi* strains. Sequence *Theileria* (AF162432) was used as outgroup. Significant bootstrap values are indicated.

of 30 nucleotides (23.33%) including two gaps (one of 1 bp, another of 2 bp), most of them localized in the 5'-end primer region and just two in the 3'-end (Figure 2). Furthermore, the melting temperature of these primers is 66.3°C for rVIV1 and 73.2°C for rVIV2 [32], while the PCR is performed at 58°C [27,33], therefore a perfect alignment is not

necessary and a *P. cynomolgi* amplification is very possible. The nested PCR assay developed by Snounou and co-workers has been widely used in Southeast Asia in numerous studies with great success, as evidenced by the literature [33-35]. However, based on the experience of this case and according to the primer alignment performed, it is



very possible that vivax primers designed (rVIV1-rVIV2) could cross react with *P. cynomolgi* leading to false positive results for *P. vivax*.

Malaysia is a country endemic for malaria, particularly in the forested, hilly and underdeveloped interior areas of Malaysian Borneo (Sabah and Sarawak states) and Peninsular Malaysia. There is no risk in urban, suburban or coastal areas, including the east coast where the patient lives. Since the Malaria Eradication Programme started in the states of Sabah and Sarawak in 1961 [36] and in Peninsular Malaysia in 1967, malaria cases have dropped drastically over the years [37]. The major *Plasmodium* species are *P. vivax* (70%) and *P. falciparum* (30%) [38]. In some areas zoonotic malaria cases by *P. knowlesi*, morphologically indistinguishable from *P. malariae*, are frequent [6].

The symptoms of the patient were non-specific, she experienced episodes of mild to moderate 24-hour cycles of morning fevers with chills and rigor, cough and cold which mimicked a flu-like syndrome. These clinical symptoms were similar to those described in non-natural infection in humans and were usually present only during febrile episodes. These last experimental infections were performed with laboratory strains, which can be less virulent than natural strains [25]. Although patient experienced fever at 24 hourly intervals, when it was expected every 48 hours, like asexual cycle period of *P. cynomolgi*, previous reports of infected volunteers with *P. cynomolgi* showed that fever had different presentations, from afebrile to daily or tertian fever [3,25].

Despite she lives in a malaria-free area, physicians suspected malaria because the patient experienced the characteristic cyclic fever with chills. A malaria infection by *P. malariae*/*P. knowlesi* was the final diagnosis in the hospital and patient was treated with chloroquine, the fever and symptoms resolved and did not show any complications and no relapse at the time of writing this report. Treatment with primaquine to eliminate hypnozoite forms, characteristic of *P. vivax* and *P. cynomolgi*, was not prescribed as patient was diagnosed as *P. malariae*/*P. knowlesi*. Infections produced in many volunteers by mosquito bite in the 1950s to 1970s with *P. cynomolgi*

sporozoite showed symptoms of moderate severity which were easily controlled by simple medications or even without treatment [25]. In these last volunteers no relapses were described which could indicate that hypnozoites of *P. cynomolgi* in humans are not activated to become hepatic schizonts, which suggests that a specific treatment with primaquine is not necessary to avoid relapses.

## Conclusions

This report describes the first known case of naturally acquired *P. cynomolgi* malaria in humans.

Morphologically, *P. cynomolgi* is indistinguishable from *P. vivax*, and as shown in this report, one of the most used PCR for malaria infection can characterize those infections as *P. vivax*. Microscopic examination of peripheral blood by thick and thin film is the golden standard for malaria diagnosis and species identification. Despite the high PCR sensitivity and specificity to detect malaria parasites in the blood, it has not been established as a routine diagnostic method in reference central laboratories to correct misdiagnosis in species identification, as well as increasing sensitivity in cases of individuals with low parasitaemia or asymptomatic carriers. As shown in this report and others, misdiagnosis in species identification can be more frequent than expected, especially in relation to non-human malaria, such as *P. knowlesi* or *P. cynomolgi* [4-6,25], as well as human infections involving *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. knowlesi* [39].

Simian *Plasmodium* species could routinely infect humans in Southeast Asia and the correct diagnosis could be missed since it is not possible by microscopy to accurately identify *Plasmodium* species with similar morphology, such as that observed between *P. cynomolgi* and *P. vivax*. The application of new diagnostic methods is necessary to distinguish between the human and monkey malaria species. Further epidemiological studies, incriminating the mosquito vector(s), must be performed to know the relevance of cynomolgi malaria and its implication on human public health and in the control of human malaria.

The importance of zoonotic malaria transmissible by non-human primates cannot be ignored in view of

increasing interactions between humans and the wild animals in the process of urbanization.

## Consent

Oral and written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images after explanation of the report objectives.

## Abbreviations

Bp: Basepairs; DNA: Deoxyribonucleic acid; IMR: Institute for medical research; MAPELAB: Malaria & emerging parasitic diseases laboratory; NG-PCR: Nested *Plasmodium* genus PCR; NM-PCR: Nested multiplex malaria PCR; PCR: Polymerase chain reaction; SSU rRNA: Small subunit ribosomal ribonucleic acid.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JMR supervised molecular characterization of parasite, conceived the study, its design and coordination, analysed the data and corrected the manuscript. THT carried out the molecular methods (NM-PCR and NG-PCR), analysed the sequence alignment, the data and drafted the manuscript. SH participated in the design and coordination of the study, and drafted the manuscript. AIJ and NI performed the patient DNA isolation, stained and examined the slides by microscopy and carried out the molecular methods (Snounou-PCR and Singh-PCR assays). ML was the responsible the sequencing and archive blood sample. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge the patient for allowing us to publish her case. The authors would like to thank the Director General of Health Malaysia for his permission to publish this paper. We thank the Director for the Institute for Medical Research (IMR) Kuala Lumpur, for her review and support in publishing this paper. We gratefully acknowledge Dr Balbir Singh, University Malaysia Sarawak for helpful reviews and valuable suggestions. This work was supported by the Interuniversity Cooperation Programme (AECID grant and A1/035539/11) and IMR/NIH Project NMRR-11-410-9622. THT was financed by a fellowship from the Instituto de Salud Carlos III.

## Author details

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Microbiology Centre, Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Parasitology Unit, Institut Penyelidikan Perubatan, Institute for Medical Research, Jalan Pahang, Kuala Lumpur 50588, Malaysia.

Received: 13 December 2013 Accepted: 18 February 2014

Published: 24 February 2014

## References

- Contacos PG: Primate malaria: man and monkeys. *J Wildl Dis* 1970, **6**:323–328.
- Chin W, Contacos PG, Collins WE, Jeter MH, Alpert E: Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg* 1968, **17**:355–358.
- Contacos PG, Elder HA, Coatney GR, Genther C: Man to man transfer of two strains of *Plasmodium cynomolgi* by mosquito bite. *Am J Trop Med Hyg* 1962, **11**:186–193.
- Kantele A, Jokiranta TS: Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis* 2011, **52**:1356–1362.
- Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR: A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science* 1965, **149**:865.
- Singh B, Kim SL, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004, **363**:1017–1024.
- Baird JK: Malaria zoonoses. *Travel Med Infect Dis* 2009, **7**:269–277.
- Coatney GR, Elder HA, Contacos PG, Getz ME, Greenland R, Rossan RN, Schmidt LH: Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. *Am J Trop Med Hyg* 1961, **10**:673–678.
- Eyles DE, Coatney GR, Getz ME: Vivax-type malaria parasite of macaques transmissible to man. *Science* 1960, **131**:1812–1813.
- Schmidt LH, Greenland R, Genther CS: The transmission of *Plasmodium cynomolgi* to man. *Am J Trop Med Hyg* 1961, **10**:679–688.
- Contacos PG, Lunn JS, Coatney GR, Kilpatrick JW, Jones FE: Quartan-type malaria parasite of new world monkeys transmissible to man. *Science* 1963, **142**:676.
- Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Martinez MC, Lanza M, Arroyo E, Rubio JM: First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar J* 2010, **9**:219.
- Coatney GR, Chin W, Contacos PG, King HK: *Plasmodium inui*, a quartan-type malaria parasite of Old World monkeys transmissible to man. *J Parasitol* 1966, **52**:660–663.
- Contacos PG, Coatney GR, Orihel TC, Collins WE, Chin W, Jeter MH: Transmission of *Plasmodium schwezi* from the chimpanzee to man by mosquito bite. *Am J Trop Med Hyg* 1970, **19**:190–195.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira NJ: Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull World Health Organ* 1966, **35**:805–808.
- Collins WE: *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annu Rev Entomol* 2012, **57**:107–121.
- Wiwanitit V: Human knowlesi malaria and neurological complication: a new thing to be discussed in tropical neurology. *Acta Neurol Taiwan* 2011, **20**:228.
- William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, Khoo S, Frederick C, Jelip J, Anstey NM, Yeo TW: Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:1248–1255.
- Van den EP, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, Hung LX, Manh HN, Anne J, D'Alessandro U, Erhart A: Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J* 2009, **8**:249.
- Berry A, Iriart X, Wilhelm N, Valentin A, Cassaing S, Witkowski B, Benoit-Vical F, Menard S, Olgner D, Fillaux J, Sire S, Le Coustumier A, Magnaval JF: Imported *Plasmodium knowlesi* malaria in a French tourist returning from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84**:535–538.
- Bronner U, Divis PC, Farnert A, Singh B: Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar J* 2009, **8**:15.
- Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B: Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis* 2009, **49**:852–860.
- Hoosen A, Shaw MT: *Plasmodium knowlesi* in a traveller returning to New Zealand. *Travel Med Infect Dis* 2011, **9**:144–148.
- Kantele A, Marti H, Felger I, Muller D, Jokiranta TS: Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1434–1436.
- Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG: The primate malaria. In *Division of Parasitic Disease, producers*. 10th edition. Atlanta, GA: CDC; 2003. original book published in 1971.
- Vythilingam I, Noorazian YM, Huat TC, Jiram AI, Yusri YM, Azahari AH, Norparina I, Noorain A, Lokmanhakim S: *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in Peninsular Malaysia. *Parasit Vectors* 2008, **1**:26.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V, Thaithong S, Brown KN: High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315–320.
- Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M: Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**(1):S199–S204.
- Ta TH, Ali-Tammam M, Lanza M, Rubio JM: Detection and identification of *Plasmodium* species by nested multiplex malaria PCR. In *Manual of molecular methods for microbiological studies*. 1st edition. Edited by Merino L, Giusiano G. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología; 2011:109–110.
- Van de Peer Y, De Wachter R: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* 1994, **10**:569–570.

31. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673–4680.
32. *DNA Oligos - modified & non-modified.* <http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool>.
33. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA: **A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**:687–692.
34. Joveen-Neoh WF, Chong KL, Wong CM, Lau TY: **Incidence of malaria in the interior division of Sabah, Malaysian Borneo, based on nested PCR.** *J Parasitol Res* 2011, **12**:104284.
35. Siribal S, Nakasiri S, Looareesuwan S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P: **Identification of human malaria parasites and detection of mixed infection in Thai patients by nested PCR.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004, **35**:5–9.
36. Rahman KM: **Epidemiology of malaria in Malaysia.** *Rev Infect Dis* 1982, **4**:985–991.
37. Lim ES: **Current status of malaria in Malaysia.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992, **23**(4):43–49.
38. World Health Organization: *World Malaria Report 2012.* Geneva, Switzerland: WHO; 2012.
39. Barber BE, William T, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM: **Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*.** *Malar J* 2013, **12**:8.

doi:10.1186/1475-2875-13-68

**Cite this article as:** Ta et al.: First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria Journal* 2014 **13**:68.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





**IV.4.-Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *M. perstans* in the Amazon region.**

**T Ta<sup>1</sup>**, R López-Vélez<sup>3</sup>, M Lanza<sup>1</sup>, AJ Shelley<sup>4</sup>, JM Rubio<sup>1</sup>, SLB Luz<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Cra. Majadahonda Pozuelo Km. 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>3</sup>Medicina Tropical & Parasitología Clínica. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Department of Entomology, Natural History Museum, London, United Kingdom.

Publicado en: **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 105(6):823-828, September 2010.**



## RESUMEN

Presentamos una técnica molecular denominado reacción en cadena de la polimerasa anidada para filarias (Nested-Filaria PCR), que se basa en la amplificación del espaciador intergénico 1 (ITS-1) del ADN ribosómico capaz de distinguir tres especies de filarias simultáneamente (*Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* y *Mansonella perstans*) por tamaño del amplicón y que se encuentran presentes en la Región Amazónica. Las detecciones obtenidas con la Nested-Filaria PCR son coincidentes con los resultados de la microscopía.

La Nested-Filaria PCR es altamente sensible y específica, detecta infecciones de baja carga parasitaria en los seres humanos y vectores. No presenó amplificaciones cruzadas con otros parásitos de la sangre, ni falsos positivos.

El método funciona de manera eficiente con muestras de sangre entera, sangre impregnadas en papel de filtro y biopsia de piel. Este método puede, por tanto, ser adecuado para evaluar la eficacia de los programas de control de filaria en las Amazonas, tanto en el huésped humano como en el vector.

Al diferenciar específicamente las principales especies de filaria simpátricas, esta técnica también podría mejorar la investigación epidemiológica en la región.



# Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region

Thuy-Huong Ta Tang<sup>1</sup>, Rogelio López-Vélez<sup>3</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Anthony John Shelley<sup>4</sup>,  
Jose Miguel Rubio<sup>1</sup>, Sérgio Luiz Bessa Luz<sup>2/+</sup>

<sup>1</sup>Malaria y Protozoos Emergentes, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España <sup>2</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, Brasil

<sup>3</sup>Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>4</sup>Department of Entomology, Natural History Museum, London, United Kingdom

*We present filaria-nested polymerase chain reaction (PCR), which is based on amplification of first internal transcribed spacer rDNA to distinguish three parasitic filarial species (Onchocerca volvulus, Mansonella ozzardi and Mansonella perstans) that can be found in the Amazon Region. Nested PCR-based identifications yielded the same results as those utilizing morphological characters. Nested PCR is highly sensitive and specific and it detects low-level infections in both humans and vectors. No cross-amplifications were observed with various other blood parasites and no false-positive results were obtained with the nested PCR. The method works efficiently with whole-blood, blood-spot and skin biopsy samples. Our method may thus be suitable for assessing the efficacy of filaria control programmes in Amazonia by recording parasite infections in both the human host and the vector. By specifically differentiating the major sympatric species of filaria, this technique could also enhance epidemiological research in the region.*

Key words: nested PCR - 18S rDNA - ITS-1 - onchocerciasis - mansonelliasis - Brazil

The phylum Nematoda contains the filarial round worms of the superfamily Filarioidea, which parasitize humans as well as animals. Human filariae are vector-borne and are responsible for various diseases, including human onchocerciasis (*Onchocerca volvulus*), lymphatic filariasis (*Brugia malayi*, *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti*), loiasis (*Loa loa*) and mansonelliasis (*Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella streptocerca*) (Morales-Hojas 2009). In Brazil, four out of the preceding eight filarial species occur: *O. volvulus* (Bearzoti et al. 1967), *M. ozzardi* (Rachou et al. 1954, Moraes et al. 1983), *W. bancrofti* (Causey et al. 1945) and *M. perstans* (Orihel 1967, Kozek et al. 1983, Formica & Botto 1990). Of these, only *O. volvulus* and *M. ozzardi* significantly affect humans. In Brazil, *O. volvulus* is found in the northwestern state of Roraima (RR) and in the northern state of Amazonas (AM), where it mainly affects Yanomami Indians (Shelley 2002), but another focus of the disease has been described in Central-western Brazil (Maia-Herzog et al. 1999). The less pathogenic *M. ozzardi* occurs mainly in AM, south of the Amazon River, and in an area in northern RR;

it occurs sympatrically with *O. volvulus* in some areas within the Amazonian onchocerciasis focus (Shelley 2002, Medeiros et al. 2009). Following several years of control programmes, *W. bancrofti* is now uncommon and is restricted to urban and peri-urban areas of Belém and Recife, with some cases of autochthonous transmission in neighboring states (Medeiros et al. 2003). It is also possible that *M. perstans* is present in the Brazilian Amazon because it occurs sympatrically with *M. ozzardi* in the neighboring regions of southern Colombia (Kozek et al. 1983), western Guyana (Orihel 1967) and Venezuela (Formica & Botto 1990). Accurate identification is, therefore, essential in studies on *O. volvulus*, *M. ozzardi* and *M. perstans* epidemiology and transmission in Brazil and circumjacent countries.

Nematode species are frequently identified and distinguished on the basis of morphological features, the hosts that they infect, their transmission patterns, their pathological effect on the hosts and their geographical origin (Gasser 2006). Diagnosis and epidemiological surveys are traditionally based on the identification of microfilariae in thick blood films or in preparations from skin biopsies. However, these techniques are labor intensive, not always accurate, tedious, time consuming and often impractical. Furthermore, these approaches require skilled microscopists to distinguish species of microfilariae that may coexist in one region, colonize the same tissues and be transmitted by the same vector (Walther & Muller 2003). In Brazil, and especially in Amazonia, atypical filarial localizations in the human host make microscopic diagnosis complicated. Thus, *O. volvulus* microfilariae, generally present in the skin,

Financial support: Spanish Ministry of Science and Innovation (PET2007\_217), CNPq (483810/2007-0)

+ Corresponding author: sergioluz@amazonia.fiocruz.br

Received 5 April 2010

Accepted 22 July 2010

have been detected in blood samples (Fuglsang & Anderson 1974, Duke et al. 1975) and *M. ozzardi* microfilariae have been found in skin, although they are generally found in peripheral blood (Ewert et al. 1981, Moraes et al. 1983). The traditional approach of one filarial species being transmitted by a single genus of diptera fly that will then provide clues for the classification of additional filarial species no longer holds. Both *M. ozzardi* and *O. volvulus* are transmitted by blackflies (Simuliidae) in the Brazilian Amazon (Shelley 2002). In Brazil, *M. ozzardi* is carried by flies from the genus *Simulium*, the same vector utilized by *O. volvulus*, while in Latin America, *M. ozzardi* is generally transmitted through the bite of *Culicoides* (Shelley & Coscarón 2001). The parasite is the same species, since nuclear ribosomal DNA sequences from simuliid-transmitted populations of *M. ozzardi* in Brazil and from simuliid and *Culicoides*-transmitted populations in Argentina were the same (Moraes-Hojas et al. 2001).

Identification of *M. ozzardi*, *M. perstans* and *O. volvulus* is straightforward when individuals are in the adult stage. However, only adult *O. volvulus* are easy to find in superficial skin nodules. Adult *M. ozzardi* and *M. perstans* are more difficult to locate because of their presence internally in the mesentery. Therefore, it is customary to base routine identification on the larval form in humans, the microfilaria. Microfilariae are morphologically distinguishable by the position within the body of the constituent nuclei (Sasa 1976, Post et al. 2003). The detection of filarial larvae in vectors is also based on conventional dissection techniques and morphological criteria for identifying filarial stages and for distinguishing species. Identification of filarial species in Brazil is only possible when organisms are in the microfilarial and infective larval stages; L1 and L2 larvae, those most commonly encountered, cannot be identified.

In order to overcome the limitations of conventional microscopic diagnosis for filarial species identification, other methods such as serodiagnosis and antigen detection have been used with varying levels of success (Vincent et al. 2000, Ramzy 2002, Molyneux 2009). The use of an enzyme linked immunosorbent assay test for identifying *O. volvulus* failed in Brazil because of cross-reactivity between this species and *M. ozzardi* (Shelley et al. 2001). Nucleic acid techniques provide powerful tools for the diagnosis of several parasitological diseases including malaria, leishmaniasis and Chagas disease. Strategically, the polymerase chain reaction (PCR) approach fulfils several objectives related to the diagnosis of filariasis in the human host and the detection of filarial larvae in the vector because it can detect a single worm and is cost effective (Ramzy 2002). Several PCR methods have been described for the specific diagnosis of filariasis, most of which use repetitive DNA, including ribosomal genes, to detect *M. streptocerca* (Fischer et al. 1998) or *O. volvulus* and *M. ozzardi* in Brazil (Moraes-Hojas et al. 2001); specific nematode genes, such as Major Sperm Protein, have also been used (Hojas & Post 2000, Walther & Muller 2003, Gasser 2006).

The method developed for *O. volvulus*, based on the amplification of a repetitive sequence of 150 nucleotides (designated O-150) by PCR, demonstrated cross-reac-

tivity with other filarial species; thus, a species-specific probe was required for diagnosis (Meredith et al. 1991, Zimmerman et al. 1994, Maia-Herzog et al. 1999).

Only a small subset of methods is able to differentiate several nematodes in the same PCR reaction, generally after enzymatic digestion (Nuchprayoon et al. 2005).

The objective of this work is to provide an accurate molecular identification method that is able to characterize the three human sympatric filariae known to inhabit the Amazon Region of Brazil and neighboring countries, using a specific and sensitive nested PCR. The method could be used in the different filarial control programmes carried out in the Amazon Region of Brazil. This PCR is designed to amplify the internal transcriber spacers of the ribosomal gene of filarial species. The size of this region varies among *O. volvulus*, *M. ozzardi* and *M. perstans* and it is expected to yield amplicons of different sizes for each species.

## SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

*O. volvulus* was isolated from skin biopsies from two patients from RR, Brazil. *M. ozzardi* was obtained as dried blood-spots on Whatman filter paper from five patients identified by microscopic examination in RR, Brazil. *M. perstans* was isolated from whole blood of African patients attending the Tropical Medicine and Clinical Parasitology Unit of Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain and was diagnosed microscopically after concentration.

Amplification controls included *Loa loa* and *W. bancrofti*, which were isolated, respectively, from an Equatorial Guinean patient and a Brazilian patient. Furthermore, filariae-negative samples that were known to be positive or negative for other tropical parasites, such as *Plasmodium* spp, were used as negative controls, together with five microscopically negative samples obtained in the same collection as the *M. ozzardi*-positive samples.

In summary, the study was carried out on two skin biopsies (RR), 12 dried blood-spots on filter paper (RR) and 10 whole-blood samples of African origin [Hospital Ramón y Cajal and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)] with several filariae-negative samples used as negative controls.

Brazilian samples were obtained as part of a study approved by the Research Ethical Committee of the Amazon Hematology and Hemotherapy Foundation, Brazil (CAAE-0001/2006). African samples were taken from the Repository Unit of the Malaria and Emerging Parasitic Diseases Laboratory of the ISCIII.

**DNA extraction** - DNA extraction from the whole blood samples (200 µL) was performed with the QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Dried blood-spots on filter paper were processed using the Chelex method (Rubio et al. 2002).

**Primer design** - Four PCR primers were designed by comparison with published ribosomal gene sequences with at least partial sequences for 18S (small subunit ribosomal RNA), ITS-1 (first internal transcribed spacer), 5.8S and ITS-2. The following species with different sequences were compared (EMBL GenBank accession indicated in parentheses): *O. volvulus* (AF228575, AF228574,

TABLE I  
List of polymerase chain reaction (PCR) primers used in the study

Primer	Sequence 5'-3'	Specificity	Position in reference sequence (gene)	Size of PCR product
UNI-1R	CGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCG	Universal	AF228575: 631 (5.8S)	712-771 <sup>a</sup>
FIL-1F	GTGCTGTAACCATACCGAAAGG	Filarias	AF227234: 1446 (18S)	
FIL-2F	GGTGAACCTGCGGAAGGATC	Filarias	AF228575: 173 (18S)	286-344 <sup>b</sup>
FIL-2R	TGCTTATTAAGTCTACTTAA	Filarias	AF228575: 493 (ITS1)	

a: size depending upon species (*Onchocerca volvulus*: 771 bp, *Mansonella perstans*: 739 bp, *Mansonella ozzardi*: 734 bp, *Wuchereria bancrofti*: 723 bp, *Loa loa*: 712 bp); b: size depending upon species (*O. volvulus*: 344 bp, *M. perstans*: 312 bp, *M. ozzardi*: 305 bp, *W. bancrofti*: 301 bp, *Loa loa*: 286 bp).

AF228565), *M. ozzardi* (AF228564, AF228560), *W. bancrofti* (AY621478, AY621477, AY843438, AY843437, AY843436, AF227234), *B. malayi* (AY621468, AY621465, AY499507, AF499130, AF036588, AF499130), *B. timori* (AF499132), *Dirofilaria immitis* (AF217800, AF036638, AF182647) and various human and mouse sequences.

The sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson et al. 1994) and the primer selection was based on general primer design criteria, including, where possible, T<sub>m</sub> = 60°C, at least 40% guanine-cytosine content and less than 60% homology with non-filarial species for the family-specific primers.

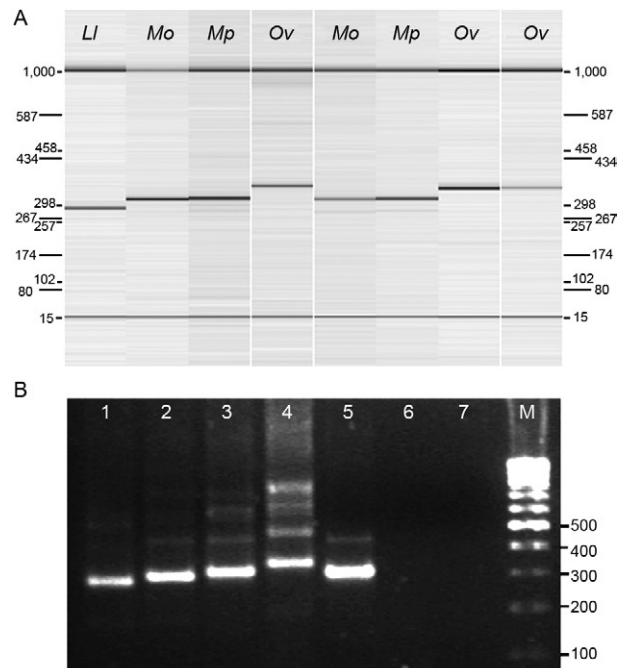
Sequence specificity and location (with respect to the GenBank sequence used as reference) of the designed primers is shown in Table I. A reverse primer (UNI-1R) was designed that would hybridize universally to all filarial species and a wide range of vertebrates, including mammals. There were two forward and one reverse primer(s) that hybridized to all filarial species (FIL-1F, FIL-2F and FIL-2R).

The primer concentrations for both reactions were determined empirically. The best primer concentrations were those where all the templates, including single and double infections, were perfectly amplified.

**Filariae detection and identification** - Filariae detection and species identification relied on a sequence of two PCRs (nested PCR), with the size of products estimated by an automatic capillary electrophoresis system (QIAxcel, BioRad) or by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining in a Gel Doc 2000 (BioRad).

The first reaction incorporates primers FIL-1F and UNI-1R and was expected to yield a product between 712-771 bp, depending on the species (Table I). This fragment is only visible when either the number of microfilariae in the sample or the DNA concentration is high.

The second PCR incorporates the products of the first reaction together with the primers FIL-2F and FIL-2R. Infection with different species of filarial species yielded products of different sizes. A band of 344 bp indicates infection with *O. volvulus*, one of 312 bp indicates *M. perstans* and one of 305 bp indicates *M. ozzardi*. Other theoretical amplified fragment sizes correspond to the following genus/species of the family:



Nested polymerase chain reaction amplification products. A: gel representation of QIAxcel capillary electrophoresis (Li: *Loa loa*, Mo: *Mansonella ozzardi*, Mp: *Mansonella perstans*, Ov: *Onchocerca volvulus*); B: agarose gel. Line 1: *Loa loa*; 2: *Wuchereria bancrofti*; 3: *M. perstans*; 4: *O. volvulus*; 5: *M. ozzardi*; 6: negative filaria sample; 7: no DNA; M: size marker 100 bp.

301 bp indicates *W. bancrofti* and 286 bp indicates *Loa loa* (Table I). *W. bancrofti* and the *Mansonella* sp. yield fragments of similar sizes. In practice, *W. bancrofti* is not difficult to distinguish in a 2.5% agarose gel. However, the difference between *M. perstans* and *M. ozzardi* is more complicated to resolve and requires the use of more sophisticated equipment or sequencing (Figure).

The PCR mixture in both reactions consisted of 75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 μM dNTP, PCR primers, 1.25 units of *Taq* DNA polymerase (Biotools B&M Labs,



TABLE II  
List of sequences submitted to the GenBank data base

Species	Isolate	Country	Accession
<i>Onchocerca volvulus</i>	Ov1/07	Brazil	EU272179
<i>Mansonella ozzardi</i>	Mo1/07	Brazil	EU272180
<i>Mansonella perstans</i>	Mp4/07	Cameroon	EU272183
<i>M. perstans</i>	Mp1/07	Sierra Leone	EU272177
<i>M. perstans</i>	Mp2/07	Mali	EU272181
<i>M. perstans</i>	Mp3/07	Equatorial Guinea	EU272182
<i>M. perstans</i>	Mp5/07	Equatorial Guinea	EU272184
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Wb1/07	Brazil	EU272178
<i>Loa loa</i>	Lloa1/07	Equatorial Guinea	EU272176

Madrid, Spain) and template DNA in a reaction volume of 50  $\mu$ L. The amount of template was 5  $\mu$ L of DNA, extracted by QIAgen. For the second reaction mixture, the template used was 2  $\mu$ L of the PCR product of the first reaction. For both reactions, a GeneAmp® PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems Laboratory) was used, beginning with 7 min at 94°C, followed by (first-round) 40 cycles of 20 s at 94°C, 20 s at 60°C and 30 s at 72°C, or (second-round) 35 cycles of 20 s at 94°C, 20 s at 50°C and 20 s at 72°C. The final cycle was followed by an extension time of 10 min at 72°C.

**Sequencing** - The amplified products were purified using Illustra DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric Healthcare), then sequenced using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing in an ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer. All amplified products were sequenced in both directions, twice.

**Specific *Loa loa* amplification** - In order to specifically detect *Loa loa* in the samples, nested PCR developed by Touré et al. (1999) was used.

## RESULTS

Filarial 18S-ITS1-5.8S rDNA sequences were aligned in order to design filariae-specific primers and the annealing regions were chosen to maximize the interspecific differences while minimising intraspecific variation. Four primers were designed: two specific filaria forward primers, FIL-1F and FIL-2F, in the 5'-end region of the 18S gene; one universal reverse primer (UNI-1R) in the 5.8S ribosomal gene and one filaria-specific reverse primer (FIL-2R) in the ITS-1 zone.

The sizes of PCR products obtained after the second amplification with FIL-2F and FIL-2R primers for each filaria species corresponded closely to the expected size. The two skin biopsies yielded fragments of approximately 344 bp. Of the 12 blood-spot samples, five yielded a 305 bp fragment (corresponding to *M. ozzardi*) and two yielded a 301 bp fragment (corresponding to *W. bancrofti*), with no amplification in the five negative samples. For all cases, the results obtained on the blood-spot samples were as expected. Of the 10 positive

whole-blood samples, seven yielded 312 bp fragments (corresponding to *M. perstans*) and three yielded 286 bp fragments (*Loa loa*). These results confirmed the data obtained by microscopy, except in one case where *Loa loa* infection was expected and the PCR yielded a 312 bp fragment corresponding to *M. perstans*. This sample was processed, together with other *Loa loa*-positive infections, with a specific PCR for *Loa loa* (Touré et al. 1999). The sample showed no amplification while the rest of the positive samples yielded fragments of 360 bp, which corresponded to the size of the expected fragment. The filaria PCR method was also tested on negative samples and samples infected with other parasites and there was no evidence of false-positive results.

All amplified fragments from the naturally infected samples were sequenced to confirm the nucleotide sequence and the size of the fragment. In all cases, the nucleotide sequence number of the amplified fragment corresponded to the expected size and the sequence with maximum homology corresponded to the appropriate filarial species. Sequences with some variations in nucleotide sequence or epidemiological data have been submitted to the GenBank database (Table II).

In order to determine the sensitivity of the technique, serial dilutions of the positive DNAs were tested. In the case of *Onchocerca* DNA, which were the only samples where DNA without human contamination was measured (38.7 and 50 ng/ $\mu$ L in each, respectively), the method amplified down to 0.003 and 0.005 ng/ $\mu$ L, respectively, which corresponds to less than a microfilaria worm (Leroy et al. 2003). When positive whole-blood samples were serially diluted, these allowed positive amplification up to 100-fold dilutions, indicating that the method is able to characterize the filaria species at very low parasite levels.

## DISCUSSION

It is difficult to assess the accuracy of the method described because any meaningful evaluation must be made with natural infections and inevitably involves comparison with other methods of diagnosis, which might be wrong. All the control and naturally infected

samples yielded the expected result for the three Amazonian filariae, *O. volvulus*, *M. ozzardi* and *M. perstans*. Likewise, the samples infected with *W. bancrofti* and *Loa loa* yielded the expected result, except in one sample where one discrepancy occurred. A microscopically diagnosed *Loa loa* infection was characterized as *M. perstans* by the fragment size (312 bp) obtained using the filaria PCR method. All the samples uninfected with filariae were negative, showing no evidence of false-positive results. It is therefore likely that the field sample that yielded *M. perstans* when filaria PCR was used to identify what had previously been labeled after morphological examination as *Loa loa* was actually *M. perstans*. Also, this sample did not show amplification when a specific *Loa loa* nested PCR was performed (Touré et al. 1999), again suggesting that the microscopic identification of *Loa loa* was incorrect. There remains the possibility of cross-contamination, but several measures to avoid it were taken (Rubio et al. 2002). Another possibility is that there was a mixed infection in the sample and that the PCR methods were unable to detect both parasites simultaneously, perhaps because the presence of a second filaria inhibits the amplification reaction in the filaria and *Loa loa* nested PCRs, while the microscopist was able to identify the more prevalent pathogen in the sample. The PCR method carried out with mixed control infection samples shows the appropriate fragment size amplifications in all different tested combinations. Furthermore, the sensitivity of the method seems to be very high. All these facts suggest a misdiagnosis in the microscopy, as this diagnostic method is highly subjective, requires considerable expertise and has limited sensitivity (Walther & Muller 2003).

The specificity test for the filaria PCR revealed that no cross-amplification occurred for any blood parasite other than those commonly found in humans.

The filaria PCR developed has a high level of sensitivity and specificity, is able to distinguish specifically between different filarial species and is suitable for detection of low-parasitemia samples. Filaria PCR could, therefore, be useful for the detection of carriers and as a tool to follow drug treatment. Moreover, the PCR methods have the advantage that no fresh samples are needed to make a correct diagnosis, as the DNA from damaged parasites in skin biopsies or peripheral blood is detectable for years by PCR, while the morphology is generally lost. The filaria PCR described here works well irrespective of the source sample, including whole blood, head nodules, blood-spots and skin biopsies.

Furthermore, filaria PCR serves a special function in the differential detection of filariae in situations where species are co-endemic. The coexistence of different species of filariae in the same individual in Amazonia has the same important epidemiological implications as in Africa (Wanji et al. 2003). In Brazil, where *O. volvulus* and *M. ozzardi* are sympatric, misidentifications and errors have already been reported (Ewert et al. 1981, Moraes et al. 1983, Morales-Hojas et al. 2001). The method previously described can only distinguish *M. ozzardi* from *O. volvulus* (Morales-Hojas et al. 2001) and a negative

result does not discount the presence of a mixed infection in peripheral blood. Our new method will also be helpful in other regions where onchocerciasis is a problem, such as West Africa, where *O. volvulus*, *M. perstans* and *M. streptocerca* coexist. Moreover, as the primers were designed from highly conserved regions of filarial 18S, 5.8S rDNA and ITS1, the method will amplify not only *O. volvulus*, *M. ozzardi* and *M. perstans*, the main objective of our study, but also amplify the sequences from other filarial parasites, including human and zoonotic filarial nematodes such as *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. timori*, *Loa loa*, *M. streptocerca* and *Dirofilaria* sp. The ITS-1 area, where FIL-2R is designed, is highly conserved among filarial species and represents a region that is important for correct transcription and gene splicing.

Unlike the PCR-RFLP method developed by Nuchprayoon et al. (2005), our assay does not digest the PCR product with restriction endonucleases and increases sensitivity using a nested amplification.

Filaria PCR is a useful method for the detection of species-specific sequences. The method can detect any form and any stage of the life-cycle of filariae in the human host or the vector and is able to specifically differentiate the sympatric filariae present in the Amazon. It may thus become a useful tool to monitor disease in campaigns seeking to control filariasis in Brazil. Finally, our method requires only conventional PCR equipment that is already available in many endemic countries, in contrast to more sophisticated technologies, such as real-time PCR.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the staff of Instituto Leônidas e Maria Deane, for their assistance throughout the project collecting and preparing blood samples in field and laboratory work.

#### REFERENCES

- Bearzoti P, Lane E, Menezes Jr 1967. Relato de um caso de oncocercose adquirida no Brasil. *Rev Paul Med* 70: 102.
- Causedy OR, Deane MP, Costa O, Deane LM 1945. Studies on the incidence and transmission of filaria *Wuchereria bancrofti* in Belém, Brazil. *Am J Hyg* 41: 143-149.
- Duke BO, Moore PJ, Vincelette J 1975. Factors influencing the passage of *Onchocerca volvulus* microfilariae into the urine. *Tropenmed Parasitol* 26: 449-468.
- Ewert A, Smith JH, Corredor A 1981. Microfilariae of *Mansonella ozzardi* in human skin biopsies. *Am J Trop Med Hyg* 30: 988-991.
- Fischer P, Büttner DW, Bamuhiga J, Williams SA 1998. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. *Am J Trop Med Hyg* 58: 816-820.
- Formica S, Botto C 1990. Filariasis focus due to *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Federal Territory of Venezuela. *J Trop Med Hyg* 93: 160-165.
- Fuglsang H, Anderson J 1974. Microfilariae of *Onchocerca volvulus* in blood and urine before, during and after treatment with diethylcarbamazine. *J Helminthol* 48: 93-97.
- Gasser RB 2006. Molecular technologies in parasitology, with an emphasis on genomic approaches for investigating parasitic nematodes. *Parassitologia* 48: 9-11.

- Hojas RM, Post RJ 2000. Regional genetic variation in the major sperm protein genes of *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea). *Int J Parasitol* 30: 1459-1465.
- Kozek WJ, Palma G, Henao A, García H, Hoyos M 1983. Filariasis in Colombia: prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (= *Dipetalonema*) *perstans* infections in the Comisaría del Guainía. *Am J Trop Med Hyg* 32: 379-384.
- Leroy S, Duperray C, Morand S 2003. Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol Biochem Parasitol* 128: 91-93.
- Maia-Herzog M, Shelley AJ, Bradley JE, Luna Dias AP, Calvão RH, Lowry C, Camargo M, Rubio JM, Post RJ, Coelho GE 1999. Discovery of a new focus of human onchocerciasis in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 235-239.
- Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa UC, Izzo TJ 2009. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 74-80.
- Medeiros Z, Menezes JA, Cesse EP, Lessa F 2003. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951-2000. *Epidemiol Serv Saude* 12: 77-86.
- Meredith SE, Lando G, Gbakima AA, Zimmerman PA, Unnasch TR 1991. *Onchocerca volvulus*: application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Exp Parasitol* 73: 335-344.
- Molyneux DH 2009. Filaria control and elimination: diagnostic, monitoring and surveillance needs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 338-341.
- Moraes MA, Shelley AJ, Dias AP, Silva CJ 1983. The concentration of *Mansonella ozzardi* microfilariae in skin capillaries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 463-466.
- Morales-Hojas R 2009. Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance and its relevance for epidemiology. *Infect Genet Evol* 9: 748-759.
- Morales-Hojas R, Post RJ, Shelley AJ, Maia-Herzog M, Coscarón S, Cheke RA 2001. Characterisation of nuclear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of a PCR-based method for their detection in skin biopsies. *Int J Parasitol* 31: 169-177.
- Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL 2005. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 73: 895-900.
- Orihel TC 1967. Infections with *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. *Am J Trop Med Hyg* 16: 628-635.
- Post RJ, Adams Z, Shelley AJ, Maia-Herzog M, Luna Dias AP, Coscarón S 2003. The morphological discrimination of microfilariae of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. *Parasitology* 127: 21-27.
- Rachou RG, Azambuja CE, Souza PS 1954. Length and width of microfilaria of *Mansonella ozzardi* and *Wuchereria bancrofti* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 6: 419-427.
- Ramzy RM 2002. Recent advances in molecular diagnostic techniques for human lymphatic filariasis and their use in epidemiological research. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl. 1): 225-229.
- Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M 2002. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 (Suppl. 1): 199-204.
- Sasa M 1976. *Human filariasis. A global survey of epidemiology and control*. University Park Press, Baltimore, 819 pp.
- Shelley AJ 2002. Human onchocerciasis in Brazil: an overview. *Cad Saude Publica* 18: 1167-1177.
- Shelley AJ, Coscarón S 2001. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 451-458.
- Shelley AJ, Maia-Herzog M, Calvão-Brito R 2001. The specificity of an ELISA for detection of *Onchocerca volvulus* in Brazil in an area endemic for *Mansonella ozzardi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 171-173.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Touré FS, Mavoungou E, Deloron P, Egwang TG 1999. Comparative analysis of 2 diagnostic methods of human loiasis: IgG4 serology and nested PCR. *Bull Soc Pathol Exot* 92: 167-170.
- Vincent JA, Lustigman S, Zhang S, Weil GJ 2000. A comparison of newer tests for the diagnosis of onchocerciasis. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 253-258.
- Walther M, Muller R 2003. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). *Adv Parasitol* 53: 149-193.
- Wanji S, Tendongfor N, Esum M, Ndindeng S, Enyong P 2003. Epidemiology of concomitant infections due to *Loa loa*, *Mansonella perstans*, and *Onchocerca volvulus* in rain forest villages of Cameroon. *Med Microbiol Immunol* 192: 15-21.
- Zimmerman PA, Guderian RH, Aruajo E, Elson L, Phadke P, Kubofcik J, Nutman TB 1994. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. *J Infect Dis* 169: 686-689.

"

#### **IV.5. Atypical *M. ozzardi* microfilariae from an endemic area of Brazilian Amazonia and the questionable existence of *M. perstans* in South America**

**Thuy H. Ta<sup>1</sup>**, Sergio L.B. Luz<sup>2</sup>, Francisco J. Merino<sup>3</sup>, Isabel de Fuentes<sup>1</sup>, Rogelio López-Vélez<sup>4</sup>, Tatiana A.P. Almeida<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Cláudia M.M. Abraham<sup>5</sup>, Jose M. Rubio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Microbiology Center. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda-Pozuelo Km. 2.5 Road, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>3</sup>Severo Ochoa University Hospital, Leganés, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Tropical Medicine & Clinical Parasitology, Infectious Diseases Department, Hospital Ramón y Cajal , Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, Brazil.

Publicado en: ***American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.***( AJTMH-15-0654, 09-Sep-2015). Bajo revisión.

"

## RESUMEN

Las Mansonelosis son endémicas en varias regiones de África, el Caribe y América Latina. *Mansonella ozzardi* y *M. perstans* han sido registradas en América Latina, muchas de las áreas se encuentran dentro de las regiones amazónicas. Se realiza un estudio morfológico y molecular de microfilarias en Pauini (Brasil). Las muestras de sangre se recogieron de cuarenta individuos y se analizaron por frotis de sangre teñido con Giemsa y por diferentes métodos moleculares: la Filaria Nested PCR (FnPCR) y una PCR anidada que detecta el gen de la Major Sperm Protein (MSP). Por microscopía, catorce de los cuarenta fueron positivos: las once como *M. ozzardi* y tres como pseudo infecciones por *M. perstans*. Por métodos moleculares ambos detectaron diecinueve casos positivos como *M. ozzardi*, incluidos los catorce individuos detectados por microscopía, sin diferencias genéticas detectables entre las diecinueve muestras positivas. Se debate la morfología y la presencia de *M. perstans* en América Latina





**“Atypical *M. ozzardi* microfilariae from an endemic area of Brazilian Amazonia and the questionable existence of *M. perstans* in South America”**

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine &amp; Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	TA-TANG, THUY-HUONG; Instituto de Salud Carlos III, Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory Luz, Sergio; Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ, Parasitology Merino, Francisco; Severo Ochoa University Hospital, Microbiology and Parasitology Fuentes, Isabel; Centro Nacional de Microbiología, Parasitología López-Vélez, Rogelio; Hospital Ramón y Cajal, Tropical Medicine. Infectious Diseases Department Almeida, Tatiana; Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ, Parasitology Lanza, Marta; Instituto de Carlos III, Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory Abraham, Claudia; Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, HEMOAM Rubio, Jose Miguel; Instituto de Carlos III, Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory
Key Words:	Mansonella Infections, Molecular Biology, Filariasis

**Running title:** Atypical *M. ozzardi* from an endemic area of Brazil

**Title:** “Atypical *M. ozzardi* microfilariae from an endemic area of Brazilian Amazonia and the questionable existence of *M. perstans* in South America”

**Authors:** Thuy H. Ta<sup>1</sup>, Sergio L.B. Luz<sup>2</sup>, Francisco J. Merino<sup>3</sup>, Isabel de Fuentes<sup>1</sup>, Rogelio López-Vélez<sup>4</sup>, Tatiana A.P. Almeida<sup>2</sup>, Marta Lanza<sup>1</sup>, Cláudia M.M. Abrahim<sup>5</sup>, Jose M. Rubio<sup>1\*</sup>.

**Author affiliations:**

<sup>1</sup>Malaria & Emerging Parasitic Diseases Laboratory, Parasitology Department, National Microbiology Center. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda-Pozuelo Km. 2.5 Road, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>3</sup>Severo Ochoa University Hospital, Leganés, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Tropical Medicine & Clinical Parasitology, Infectious Diseases Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, Brazil.

**\*Corresponding author:** Dr. José Miguel Rubio. Cra. Majadahonda-Pozuelo Km 2,5.

Majadahonda, 28220 Madrid (Spain); email: [jmrubio@isci.iii.es](mailto:jmrubio@isci.iii.es). Phone: +34918223420. Fax: +34915097034.

**Keywords:** *M. ozzardi*, *M. perstans*, atypical microfilariae, Brazilian Amazonia, Nested PCR.

**Abstract:** 136 words

**Text:** 1064 words

27 **Abstract**

28       Mansonellosis are endemic in several regions of Africa, the Caribbean and Latin-America.  
29       *Mansonella ozzardi* and *M. perstans* have been reported in Latin-America, many of the areas lie  
30       within the Amazon regions. A morphological and molecular microfilariae study was performed in  
31       Pauini (Brazil). The blood samples were collected from forty individuals and were analysed by  
32       Giemsa-stained blood film and by different molecular methods: the Filaria Nested PCR (FnPCR)  
33       and a Nested PCR which detects the Major Sperm Protein (MSP) gene. By microscopy, fourteen  
34       out of forty were positive: eleven as *M. ozzardi* and three as *M. perstans*-like infections. Both  
35       molecular methods detected nineteen positive cases as *M. ozzardi*, including those fourteen  
36       individuals detected by microscopy, without detectable genetic differences among any of the  
37       nineteen positive samples. The morphology and presence of *M. perstans* in Latin-America is  
38       discussed.

**Introduction**

Mansonellosis is a filarial disease caused by nematodes from the genus *Mansonella* which is transmitted by the bite of bloodsucking insects (*Simulium* in the Amazonia and *Culicoides* in the Caribbean regions, in Central and South America and in Africa).<sup>1</sup> The Mansonellosis disease is generally considered as innocuous, with few symptoms (fever, headache, articular pain and erythematous cutaneous plaques with pruritus); however the causal relation to *Mansonella* infection often remains unclear.<sup>1</sup> Microscopic examination of thick and thin peripheral blood smears stained with Giemsa or other appropriate stains is often regarded as the “gold standard” method of microfilariae diagnosis.<sup>1,2</sup> Two species of *Mansonella* are described in Latin America, *M. ozzardi* and *M. perstans*, the latter is restricted to the Amazon regions of Venezuela, Colombia and Guyana.<sup>3-7</sup> In the last decades, a number of unidentified/atypical microfilariae have been described in the Amazonia areas of Brazil, Peru and Venezuela based on their morphological characteristics, which suggest *M. perstans*-like.<sup>8-10</sup> Morphologically, the most important features to identify microfilariae species are size, shape and space of the tail, presence or absence of a sheath and terminal and arrangement of nuclei of the tail but all this morphological characteristic are not enough to identify these filaria species and molecular methods are necessary.<sup>1,2,11</sup>

**Material and Methods**

In order to make a molecular characterization of the atypical microfilaria in the Brazilian Amazonia, a study of the inhabitants of Pauini was performed. This area was chosen because in a previous study to validate the Filaria Nested PCR (FnPCR),<sup>12</sup> it had the highest prevalence of mansonellosis in the studied communities (unpublished data).

Forty individuals were included in the study. Samples were obtained as part of a study approved by the Research Ethical Committee of the Amazon Hematology and Hemotherapy Foundation, Brazil. Blood samples were analysed by Giemsa-stained blood film and by different molecular methods. Morphological identification was performed by six expert microscopists, who

did not know the origin of the samples, in-line with published guidelines.<sup>11</sup> In the case of discrepancies, blood films were re-examined by the same microscopists. The molecular methods were a FnPCR that targets the ITS-1 region of the ribosomal gene, which differentiates filarial species by the amplified fragment size and by gene sequence,<sup>12</sup> and one Nested PCR which detects the Major Sperm Protein (MSP) gene. This Nested PCR uses, as first amplification process, the MSP-PCR, developed by Hojas & Post (2000)<sup>13</sup> and as nested one in-house method, using primers MSP-1F (5'-ACCTGGTGACATCCACACACAAC-3') and MSP-2R (5'-CCAGGACACCGCATGGTGGATC-3') at 55°C for alignment.

## Results

Fourteen out of 40 blood films analyzed by microscopy showed microfilariae (35%). Eleven were characterized as *M. ozzardi* (78.6%) and the other three (21.4%) were characterized as *M. perstans*-like by five of the six microscopists and as *M. ozzardi*-like by the sixth. The morphological description of these atypical microfilariae included no sheath, unusual size (range 126-180 x 3.6 µm), short cephalic space, nuclei that reached the tip of the tail and shorter, blunt and less attenuated tail than *M. ozzardi* (Table 1, Figure 1).

The FnPCR detected nineteen positive cases (47.5%), five more than microscopy, all of which were characterized as *M. ozzardi* by fragment size and sequence. The phylogenetic tree from sequences alignment of positive cases with all filarial species in GenBank yielded a single cluster with *M. ozzardi* (data not shown). The Nested PCR detecting MSP gene showed that the same nineteen samples were positive, showing the expected fragment of 406 bp which belonged to *M. ozzardi*; also was used in proven *M. perstans* samples, giving a fragment size of 395 bp. Atypical microfilaria amplified fragments for ITS-1 and MSP were sequenced and *M. ozzardi* identification was confirmed (ITS-1: KR952332, KR952333, KR952334, *M. ozzardi*-MSP: KT224437, KT224438, KT224439 and *M. perstans*-MSP: KT224440).

**Discussion**

More than 20% of microfilariae present in the Pauini inhabitants showed an atypical morphology, which several microscopists characterized as *M. perstans*. Using conventional parasitological techniques differentiation between the microfilariae species is quite difficult, since there are no reliable morphological criteria to tell them apart.<sup>1</sup> It becomes more complicated when two or more species are found in sympatry, which could have medical significance, i.e. in the monitoring for onchocerciasis recrudescence.<sup>14</sup> In contrast with other microfilariae known to routinely to infect humans in the Brazilian Amazon, the microfilariae of *M. ozzardi* are reported to be 163-203 x 3-5 µm and to have no nuclei at the end of their tails; *M. perstans* are recorded as having dimension of 190-200 x 4-5 µm and as having nuclei at the end of their tails (Table 1).<sup>11</sup> The observed atypical *Mansonella* microfilariae in this report had uncommon sizes (ranging from 126-180 x 3-3.6 µm), smaller than both *M. ozzardi* and *M. perstans*, although the average was smaller, overlapped with the size of *M. ozzardi*. The method of specimen preparation is known to have a large effect on microfilariae body-size measurements but all samples were treated in the same way and length measurements are comparable with those published by previous authors for normal and atypical microfilariae.<sup>8-10</sup> The cephalic space of these *M. perstans*-like had two nuclei followed of single nucleus, very similar to other atypical microfilariae reported from Brazilian Amazon,<sup>8</sup> Peruvian Amazon<sup>9</sup> and Venezuelan Amazon,<sup>10</sup> in contrast *M. ozzardi* has a single nucleus in this position. Furthermore, the posterior region has blunt tail filled with nuclei similar to *M. perstans* (Table 1, Figure 1).

Molecular methods allow differentiation of the different species of filariae. In this study *M. ozzardi* was the unique species present, independently of the target used, ITS or MSP, with no detectable genetic differences among any of the nineteen positive samples.

Records of distribution and prevalence of *M. perstans* in Latin America are restricted to Colombia, Guyana and Venezuela and all of them, except one,<sup>4</sup> are from late sixties to the early eighties of last century.<sup>3;5-7</sup> Most recent reports describe atypical microfilariae besides *M. ozzardi*

but not *M. perstans*<sup>8-10</sup> and in the cases where some molecular identification had been performed, as in this report and one other,<sup>9</sup> the unique species found was *M. ozzardi*.

### Conclusions

There is a need to evaluate the real situation of *M. perstans* in Latin America, since the previous descriptions from sixties-eighties of the last century may be an atypical morphological presentation of *M. ozzardi*. Molecular techniques can have a special value in order to provide additional data and support evidences to confirm and to determine whether or not *M. perstans* is actually present in Latin America and to characterize those unidentified/atypical microfilariae.

125    **Acknowledgments:**

126            We would like to thank people of Pauini, Brazilian Amazon, for participating in the study.  
127    Thuy H. Ta was financed by a project grant from the Sanitary Research Funds, Instituto de Salud  
128    Carlos III (number CM07/00006) and by a contract associated to the Research Project MVP-  
129    1044/13 financed by EPISTEM LTD. The authors wish also to thank Dr. James Lee Crainey for  
130    careful reading and English valuable correction of the manuscript.

131

For Peer Review



## References:

1. Walther M, Muller R, 2003. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). *Adv Parasitol* 53:149-193.
2. Rosenblatt JE, 2009. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 49:1103-1108.
3. Beaver PC, Neel JV, Orihel TC, 1976. *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in Indians of southern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 25:263-265.
4. Gomez J, Guerrero R, 2000. Environmental factors and the distribution of mansonelliasis in southern Venezuela. *Parasite* 7:71-76.
5. Marinkelle CJ, German E, 1970. Mansonelliasis in the Comisaria del Vaupes of Colombia. *Trop Geogr Med* 22:101-111.
6. Kozek WJ, Palma G, Henao A, Garcia H, Hoyos M, 1983. Filariasis in Colombia: prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (= *Dipetalonema*) *perstans* infections in the Comisaria del Guainia. *Am J Trop Med Hyg* 32:379-384.
7. Orihel TC, 1967. Infections with *Dipetalonema perstans* and *Mansonella ozzardi* in the aboriginal Indians of Guyana. *Am J Trop Med Hyg* 16:628-635.
8. Adami YL, Moraes MA, Lanfredi RM, Maia-Herzog M, 2008. An atypical microfilaria in blood samples from inhabitants of Brazilian Amazon. *Parasitol Res* 104:95-99.
9. Marcos LA, Arrospide N, Recuenco S, Cabezas C, Weil GJ, Fischer PU, 2012. Genetic Characterization of Atypical *Mansonella* (*Mansonella*) *ozzardi* Microfilariae in Human Blood Samples from Northeastern Peru. *Am J Trop Med Hyg* 87:491-494.
10. Godoy GA, Orihel TC, Volcan GS, 1980. *Microfilaria bolivarensis*: a new species of filaria from man in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 29:545-547.
11. Eberhard ML, Lammie PJ, 1991. Laboratory diagnosis of filariasis. *Clin Lab Med* 11:977-1010.

156 12. Tang TH, Lopez-Velez R, Lanza M, Shelley AJ, Rubio JM, Luz SL, 2010. Nested PCR to  
157 detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi*  
158 and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:823-828.

159 13. Hojas RM, Post RJ, 2000. Regional genetic variation in the major sperm protein genes of  
160 *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea). *Int J Parasitol* 30:1459-  
161 1465.

162 14. Luz SL, Crainey JL, Shelley AJ, Rubio M, 2014. Outstanding insecurities concerning the use of  
163 an Ov16-based ELISA in the Amazonia onchocerciasis focus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:506-  
164 508.

165

Table 1. Comparing morphological characteristics among *M. ozzardi*, *M. perstans* and atypical microfilariae.

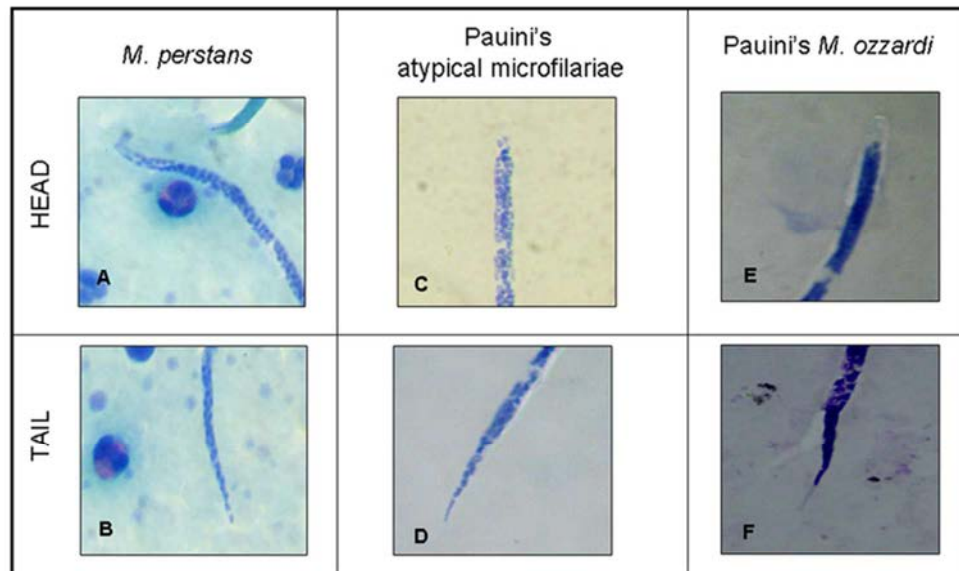
Characteristics Species (type)	Length (μm) (average μm) (ref)	Width (μm) (average μm) (ref)	Sheath (ref)	Cephalic space (ref)	Tail and tail nuclei (ref)
<i>M. perstans</i>	190-200 (195) (11)	4-5 (11)	Absent (11)	Morphological feature not described in standard textbooks for microfilariae species-diagnosis.	Tapered and bluntly. Nuclei to end of tail. (11)
<i>M. ozzardi</i>	163-203 (183) (11)	3-5 (11)	Absent (11)	After cephalic space, a single nucleus. (8-10)	Long and slender, with seven to nine nuclei that do not reach the tail end. (11)
Brazilian Amazon atypical microfilariae	Measures close to <i>M. ozzardi</i> (8)	Measures close to <i>M. ozzardi</i> (8)	Absent (8)	Two paired nuclei after the cephalic space, followed by a single one, and afterwards begin the proceeding characteristic column of nucleus (8).	The posterior extremity, where a nuclear column with 7–8 nuclei are present in a regular and aligned arrangement and a detachment from cuticle are very perceptible (8)
Peruvian Amazon atypical microfilariae	120-130 (125) (9)	ND	Absent (9)	Two nuclei followed by a single nucleus just caudal to the cephalic space (9)	ND
Venezuelan Amazon atypical microfilariae: named as <i>Microfilaria bolivarensis</i> by the authors	220-280 (250) (10)	7-8 (7.5) (10)	Absent (10)	The cephalic space is short; typically, its length is only slightly greater than its width. (11)	Posterior one-fifth tapered rather sharply. Tail is shorter, less attenuated tail than <i>M. ozzardi</i> ; is devoid of nuclei. (10)
Atypical microfilariae described in this work	126-180 (153)	3-3.6 (3.4)	Absent	Short cephalic space with two nuclei followed of single nucleus, just caudal to the cephalic space.	Nuclei reach the tip of the tail and short, blunt and less attenuated tail.

ND: No data

171 **Figure 1 legend**

172 Giemsa-stained blood film. Comparison head and tail of *M. perstans* microfilaria from Africa (A,  
173 B), atypical microfilaria (C, D) and *M. ozzardi* microfilaria (E, F).

For Peer Review



Giemsa-stained blood film. Comparison head and tail of *M. perstans* microfilaria from Africa (A, B), atypical microfilaria (C, D) and *M. ozzardi* microfilaria (E, F).  
62x47mm (300 x 300 DPI)

**IV.6. Ta Tang, TH<sup>1\*</sup>**, Moya L <sup>2,3\*</sup>, Nguema J<sup>4</sup>, Aparicio P<sup>2</sup>, Canorea I<sup>1</sup>, Lanza M<sup>1</sup>,  
Benito A<sup>2</sup>, Rubio JM<sup>1&</sup>

\*Both authors contributed equally to this work (Ambos autores contribuyeron de igual manera en la realización de este trabajo).

<sup>1</sup> Malaria & Other Emerging Parasitic Diseases Laboratory. National Microbiology Center. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain.

<sup>2</sup>, National Tropical Medicine Centre, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Jimenez Diaz Foundation University Hospital, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> National Program for Control of Onchocerciasis and other Filariasis, Ministry of Health, Malabo, Equatorial Guinea.

Publicado en: **pendiente de ser sometido**

## RESUMEN

La oncocercosis o "ceguera de los ríos", es una enfermedad parasitaria crónica transmitida por moscas negras que pertenece al género *Simulium*. La oncocercosis es una enfermedad endémica, tanto en la parte continental de Guinea Ecuatorial como en la insular, y ha sido un problema importante de salud pública en la Isla de Bioko.

*Loa loa* produce loiasis, también conocido como gusano del ojo de África, que se transmite por la picadura de tábanos del género *Chrysops*. Por lo general, los individuos infectados son microfilarémicos asintomáticos.

*Mansonella* spp. (*Mansonella perstans*, más frecuente, y *Mansonella streptocerca*) es transmitido por la picadura de insectos chupadores de sangre (*Culicoides* en todas las áreas endémicas, excepto en la Amazonía donde se transmite por *Simulium*), causa la mansonelosis, la enfermedad se considera generalmente inocua.

La isla de Bioko fue incluida en las actividades de Onchocerciasis Control Programme (OCP) en 1987 con el objetivo de eliminar la mosca negra de zonas fluviales con tasas altas de ceguera por oncocercosis. En 2005, el vector fue eliminado de la Isla de Bioko como resultado de las exitosas campañas larvicidas de la APOC.

Se buscan nuevas estrategias para estimar con precisión la situación epidemiológica y entomológica actual de la Isla de Bioko, clave para lograr la eliminación de la oncocercosis y otras filariosis.

El objetivo de este trabajo es actualizar la información de la oncocercosis y otras filariosis en la Isla de Bioko después de 18 años de intervención en masa con ivermectina utilizando métodos moleculares precisos para la identificación de filarias.

**Running title: Human Filariasis and Onchocerciasis in Bioko Island**

**Title: Geographical distribution and species identification of Human Filariasis and Onchocerciasis In Bioko Island, Equatorial Guinea**

Ta Tang TH<sup>1</sup>, Moya L<sup>2,3</sup>, Nguema J<sup>4</sup>, Aparicio P<sup>2</sup>, Canorea I<sup>1</sup>, Lanza M<sup>1</sup>, Benito A<sup>2</sup>, Rubio JM<sup>1&</sup>

**Author affiliations:**

<sup>1</sup> Malaria & Other Emerging Parasitic Diseases Laboratory. National Microbiology Center. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain.

<sup>2</sup>, National Tropical Medicine Centre, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Jimenez Diaz Foundation University Hospital, , Madrid, Spain.

<sup>4</sup> National Program for Control of Onchocerciasis and other Filariasis, Ministry of Health, Malabo, Equatorial Guinea.

**&Corresponding author:** Dr. José Miguel Rubio. Cra. Majadahonda-Pozuelo Km 2,5. Majadahonda, 28220 Madrid (Spain); email: [jmrubio@isciii.es](mailto:jmrubio@isciii.es). Phone: +34918223420. Fax: +34915097034.

**Keywords: Filariasis, Onchocerciasis, Equatorial Guinea, Molecular diagnosis**



## INTRODUCTION

The filarial infections of humans in Africa demonstrate a wide spectrum of pathology and epidemiology as well as a diversity of vectors, ecology and distribution. Imposed on this already complex pattern have been large scale intervention programmes, ongoing for 40 years, initially for onchocerciasis, and since 2000 for lymphatic filariasis (Molyneux et al., 2014).

Human filariae are vector-borne and are responsible for various diseases, including human onchocerciasis (*Onchocerca volvulus*), loasis (*Loa loa*), mansonelliasis (*Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella streptocerca*) and lymphatic filariasis (*Brugia malayi*, *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti*) (Tang et al., 2010). In Bioko Island, part of the Republic of Equatorial Guinea in West Africa, *Onchocerca volvulus*, *M. perstans*, *M. streptocerca* and *Loa loa* were described in humans (Cuello et al., 2009; El Haouri et al., 2001; Mas et al., 1995; 2006). Also *Wuchereria bancrofti* is present in the island according to the Equatorial Guinea APOC 2008 Report (unpublish). Of these, *O. volvulus* is the species that produces the most severe pathology named onchocerciasis.

Onchocerciasis or "river blindness" is a chronic parasitic disease transmitted by black flies belonging to the genus *Simulium* (Dunn et al., 2015). It causes serious morbidities due to cutaneous and ophthalmologic manifestations, including blindness, intense itching and onchocercal skin disease (Dunn et al., 2015). Onchocerciasis is an endemic disease both in mainland and insular Equatorial Guinea, and has been a major public health problem in Bioko Island (Mas et al., 2006). The *Loa loa* produces loiasis, also known as African eye worm, which is transmitted by the bite of deerflies of the genus *Chrysops*. It usually consists of asymptomatic microfilaremia but some patients have episodic angioedema in the arms and legs and other cutaneous manifestations. In the human host, *Loa loa* larvae migrate to the subcutaneous tissue where they mature to adult worms, frequently passing through the eyes, mating and producing more microfilaria (Padgett and Jacobsen, 2008). The *Loa loa* infections has

emerged as a public health problem in areas where is co-endemic with *O. volvulus*, *W. bancrofti* and other filarial parasites since mass ivermectin drug administration efforts to eliminate onchocerciasis and lymphatic filariasis can produce fatal encephalopathic reactions among highly microfilaremic *Loa*-infected individuals (Gardon et al., 1997; Fink et al., 2011). *Mansonella* spp. which is transmitted by the bite of bloodsucking insects (Culicoides in all endemic areas, except Amazonia where it is transmitted by Simulium) cause mansonellosis. The disease is generally considered as innocuous, with few symptoms, fever, headache, articular pain and erythematous cutaneous plaques with pruritus. There are two species of the genus in West Africa. *Mansonella perstans* is the more prevalent, it is widespread in many parts of Sub-Saharan Africa, where 33 countries reported cases including Equatorial Guinea (Vila Montlleo, 1990). *Mansonella streptocerca* is distributed in West and Central Africa but the real prevalence is unknown. This filarial have the characteristic to be present in skin and can be easily mistaken by no experienced laboratory worker, or when its presence is not expected, with *O. volvulus*. No data for Equatorial Guinea are available regarding mansonellosis.

Bioko Island was included in Onchocerciasis Control Programme (OCP) activities in 1987 with the aim of eliminating the vector blackfly in river areas with known high rates of onchocercal blindness (Mas et al., 1995) and from 1998 in the African Programme for Control of Onchocerciasis (APOC) with the objective of establishing sustainable Community Directed Ivermectin Distribution (CDTI) systems (Alonso, 2009; Cupp et al., 2011).

The success of the control program in Bioko Island was pointed out in 2006 showing a coverage between 48 to 62% and a reduction in prevalence from 74.5% to 38.4% (Mas et al., 2006). The last report from the APOC in 2008 (unpublished data) confirms that the coverage of the program reached 71.3%. The mass treatment along 15–17 years may have been more than needed to interrupt transmission (Dunn et al., 2015)

especially, when in 2005, the vector was eliminated in the Bioko island as result of successful APOC larviciding campaigns (Traore et al., 2009).

Despite the control achievements in Bioko Island, there is no accurate updated information on the current epidemiological situation of onchocerciasis and other filariasis in the island. Accurate identification is therefore essential in studies of prevalence of Onchocercosis, and filariasis in general, especially when other skin filarias can produce misidentification as *M. streptocerca* in Equatorial Guinea (Mas et al., 2006) or atypical filarial localizations occurring in the human host make the microscopic diagnosis complicated (Tang et al., 2010). Thus, *O. volvulus* microfilariae, generally present in the skin, have been detected in blood samples (Duke et al. 1975; Fuglsang and Anderson 1974), *L. loa* is found in blood but also in skin (El Haouri et al., 2001) and *M. ozzardi*, can be found in skin, although they are generally found in peripheral blood (Ewert et al. 1981, Moraes et al. 1983).

New strategies to accurately estimate the current epidemiological and entomological situation of Bioko Island are key to achieve the elimination of onchocerciasis and other filariasis. The objective of this work is update the information of the situation of the onchocercisosis and other filariasis in Bioko Island after 18 years of mass ivermectin intervention using accurate molecular methods for filaria identification.

## **MATERIAL AND METHODS**

**Study area.** The Island of Bioko is a part of the Republic of Equatorial Guinea, which also includes Rio Muni on the mainland and the island of Annobon. It is located in the Bay of Guinea in Central Africa about 40 km southwest of the Cameroon coast. The surface area of Bioko Island is of approximately 2017 km<sup>2</sup>, and is about 72 km in length. Most of the island's 260,000 inhabitants live in the northern part of the island. The discovery of large offshore oil reserves in the 1990's has resulted in rapid economic growth and an overall increase in incomes, although a substantial proportion of the island's residents still practice subsistence agriculture and fishing. The interior of

the island is covered with dense forests on the steep slopes of volcanoes and calderas. The highest peak on the island reaches 3,011 m above sea level. The island has a humid tropical environment. Mean daily maximum and minimum temperatures range between 29-32°C and 19-22°C, respectively.

The island of Bioko is divided into four administrative districts (Malabo, Luba, Baney and Riaba). In Malabo, in the North of Bioko, is located, with the same name, the capital of the country.

**Study design and sample size.** A cross-sectional study was conducted in Bioko Island from mid-January to mid-February 2014. A multistage sampling technique was used. Firstly, twenty communities were randomly selected, proportionally to population distribution into urban or rural areas. Secondary sampling units were randomly selected houses in each of the selected sub-districts. All persons in every selected household aged more than 5 years, who had permanently lived in Bioko Island during the last five years or longer, were included in the study. Individuals who were born outside Equatorial Guinea were excluded. Sample size was calculated according to previous estimates of onchocerciasis prevalence in the area (0-3%). The sample size was computed using Epi-Info version 3.4.1 statistical software (Statcalc) by considering the following parameters: 95%CI, 80% power and 3% standard error.

Twenty communities were selected, over half belong to Malabo district, but one was excluded as the samples were not properly conserved (Figure 1). A total of 543 subjects participated in the study, 224 men (41.25%) and 319 women (58.75%).

**Samples collection.** The study was approved by the ethical advisory boards of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) in Spain and the Ministry of Health in Equatorial Guinea (CEI PI 21\_2014). The study complied with current national and international regulations and standards for biomedical research in human subjects. All participants, parents or guardians for children, gave written informed consent prior to the enrolment in the study.

Whole blood heparinised samples (two ml) and three skin snip biopsies from lumbar regions (two from right iliac crest and one from the left iliac crest) were collected from every participant. Biopsies were immersed in saline solution previous examination under microscopy for microfilariae in the field and 24 hours after in the Malabo Hospital Laboratory. The rest of biopsies and the whole blood samples were keep at 4°C and shipping to the Microbiology National Centre (ISCIII, Madrid, Spain), where further molecular analysis were performed.

**Preparation of the DNA template.** The isolation of DNA from blood (200 µL) was performed using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany), according to the manufacturer's instructions. Skin snip biopsies DNA were extracted using the QIAamp® DNA Mini Kit. The biopsies were incubated at 56°C overnight previous to DNA extraction following the manufacturer's instructions for DNA purification from tissues. DNA, independently of sample origin, was eluted with 200 µl distilled water and stored at 4°C until use.

**Filarial detection and identification by Real Time PCR (F-RT-PCR).** Detection of filarial species were performed using a Real Time PCR targetting the internal transcribed spacer one (ITS1) of the nuclear ribosomal gene of all filarial species. Positive identification of infected sample was determined by melting temperature (T<sub>m</sub>) of the amplified fragments. T<sub>m</sub> values of 77.50°C ± 1.0°C indicate a filarial infections. Identification among filarial species is performed by agarose or automatic gel electrophoresis of F-RT-PCR amplified products. A band of 344 bp indicates infection with *O. volvulus*, one of 312 bp infection by *M. perstans*, one of 301 bp by *W. bancrofti* and 286 bp infection by *Loa loa*.

The PCR mixture consisted of 1x Quantimix Easy Probes (Biotools, B&M Labs, S.A., Spain), 0.2 µM of primer forward FIL2-F (5'-GGTGAACCTGCGGAAGGATC-3'), 0.2 µM of primer forward ITS1-Loa (5'-GGTGAACCTGCAGCTGGATC-3'), 0.375 µM of reverse primer FIL2-R (5'-TGCTTATTAAGTCTACTTAA-3'), 2x EvaGreen® Dye (Biotium, Inc. Hayward, CA, U.S.A), 5µl of template DNA in a reaction volume of 20µl.

Primers FIL2-F and FIL2-R were previously published by Tang *et al* (2010). A Rotor-Gene 6000 (Corbett, Australia) was used to perform the amplification, beginning with 3 min at 95°C, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 15 s at 50°C and 15 s at 60°C.

Detection of infected samples was determined by melt program consisting of stepwise temperature increases of 0.5°C from 60°C to 95°C with fluorescence acquisition at each temperature transition.

**Specific *Mansonella streptocerca* amplification.** In order to specifically detect *Mansonella streptocerca* in the samples, nested PCR, targetting the conserved coding region of the 5S rDNA, developed by Fischer *et al.* (1998) was used.

**Sequencing.** The amplified products were purified using Illustra DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric Healthcare, England), then sequenced using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing in an ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.). All amplified products were sequenced in both directions, twice.

## RESULTS

Only nineteen out of twenty communities were analysed as samples from one of the communities was lost during transportation.

Two out of the three skin snip biopsies from every individual were negative when they were examined by microscopy. The third biopsy was analysed by PCR (F-RT-PCR) targeting the ITS-1 rDNA, showing eleven positive cases (2.0%). Species identification by amplified fragment size of positive samples corresponds to seven *Mansonella perstans*, one *Loa loa*, one *Onchocerca volvulus* and two unknown filarial. All positive samples were confirmed by sequencing through comparison with GenBank database, the two unknown cases showing identical sequences between them and around 86 to 91% homology with *M. perstans*, *M. ozzardi* and *M. mariae*. Strong suspicious of *M. streptocerca* infections were confirmed by a specific PCR (Fischer *et al.* 1998) using as target the 5S rDNA. Sequences corresponded to 100% of homology when compared with *M. streptocerca* Fisher's publish in the manuscript. Sequence of the 5S rDNA from

*M. streptocerca* from Bioko Island was deposited in the GenBank database with accession number KT224442, also *M. streptocerca* ITS-1 rDNA sequence from Bioko Island (Equatorial Guinea) was included in the genbank database with access number KR868771. The *M. streptocerca* cases correspond to two individuals (man and woman) which took ivermectin twice in the last years. The case with *O. volvulus* corresponds to a woman who had never taken ivermectin. These cases correspond to the district of Riaba. The other positive skin snips include five *M. perstans* in the district of Riaba, two *M. perstans* in Bioko district and the *Loa loa* case in Baney district (Table 1). Fifty two out of 543 whole blood samples were positive for some filarial using the F-RT-PCR (9.6%). Forty eight cases (8.8%) were characterised as *M. perstans* and four cases (0.7%) corresponded to *L. loa* (Table 1). The district with more positives was Riaba with 26 (37.1%), followed by the district of Baney (18 cases, 17.5%) and Malabo (8 cases, 2.5%), while no case was detected in Luba (Table 1). Six out of eleven skin infected biopsies, the *Loa loa* and five *M. perstans*, have the same corresponding infection in blood. *Onchocerca volvulus*, the two *M. streptocerca* and two *M. perstans* are found exclusively in skin.

In total, without discriminating between tissues, 57 individuals (10.5%) were infected with some species of filarial. The district with more cases was Riaba with 30 cases which corresponds to 42.9% of the individuals analysed. In this district, the community 14 (Barrios Adyacentes) shows a 61.9% of population infected (Table 1).

## DISCUSSION

Although the microscopic examination of skin snips and Giemsa stained blood samples is referred as the Gold Standard method for filarial diagnosis, it is well known that this technique is not the choice for cases with low level of microfilaremia and for mixed infections and the results depend on the experience of the microscopist (Boatin et al., 2006; Tang et al., 2010). PCR offers an alternative to microscopy, which has shown in

many cases to have superior sensitivity and specificity (Nuchprayoon et al., 2005; Rubio et al., 2002; Tang et al., 2010; Touré et al., 1998).

Results in this cross-sectional study in Bioko Island show that microscopy examinations of skin biopsies in all subjects were negative while molecular methods detected eleven positive cases (2%). It is already known that ivermectin mass treatment produces a reduction of Community Microfilarial Load (CMFL), as was shown in Bioko Island in a previous study where the CMFL switched from 28.29 microfilariae/snip to 2.32 microfilariae/snip after eight years of treatment (Mass et al., 2006). The detection of a 2% of infected skin biopsies in a context with very low microfilariae load confirms the higher sensitivity of the Real Time PCR used in this study vs the microscopy. Furthermore, accurate identification provided by the molecular methods, and avoiding the microscopist's subjectivity, is essential for correct filarial identification, especially when as result of the success due to sustained onchocerciasis control activities, APOC paradigm has recently changed from control of onchocerciasis to a strategy of onchocerciasis elimination 'where feasible' (Traore et al., 2009). The new elimination goal requires the assessment of new methods with higher sensitivity and specificity than traditional methods (Olamiju et al., 2014). Ten out of eleven filarial found in skin were not *O. volvulus*, which can be easily mistaken if the microscopic observation is performed *in vivo*, detecting a 2% of positive onchocerciasis cases instead of just the 0.2%. The only positive case of *O. volvulus* was found in a young woman from Riaba district who was never included into the Onchocerciasis Control programme and never took ivermectin.

*M. streptocerca*, previously described in Bioko Island (Mas et al., 2006), was only found in two people (0.4%) from Riaba district. Ivermectin is highly effective against *M. streptocerca*, and a single dose leads to a sustained suppression of microfilariae in skin (Fischer et al., 1999). Hence the presence of *M. streptocerca*, together with the *O. volvulus* case in the same district could indicate a not full ivermectin coverage in this area. The 5S rDNA (KT224442) and the ITS-1 rDNA (KR868771) are the first



annotations for this species in the NCBI nucleotide database but the molecular identification was performed thanks to the partial nucleotide sequence of the 5S rDNA of *M. streptocerca* published by Fischer et al., (1998).

The detection of microfilariae in the skin by removing small skin snips, properly performed, is relatively painless and bloodless. The goal is to take a small, round-shaped small piece of skin cut with a scalpel. Skin snipping demands careful technical skills to prevent blood-borne infections, and the risk of person–person transmission of HIV and other pathogens (Thylefors and Alleman, 2006). The presence of *M. perstans* and *Loa loa* microfilariae in skin is rare and not well documented as it occurs with the skin filarial species *O. volvulus*, *M. streptocerca* and *Loa loa* adults. Indeed it is not possible to discharge an improper sampling when biopsies are taken, but two out of the seven *M. perstans* positive skin samples were negative in the corresponding blood sample suggesting a real presence in the skin, as was previously reported for other members of the genus as *M. ozzardi* (Ewert et al. 1981, Moraes et al. 1983).

In blood the number of microfilariae cases is higher than in skin, 9.6% against the 2%. The species most represented is *M. perstans* in 48 individuals (8.8%) spread in all the district but with higher prevalence in the Riaba district. Historically, *M. perstans* infection was considered asymptomatic but in the last period is every time more recognised as a pathogenic species (Fux et al., 2006). Several drugs, as diethylcarbamazine, praziquantel, ivermectin, and albendazole, have been used against these infections, but none has proven to be reliably and rapidly effective for most cases (Bregani et al., 2007). For this reason, the presence of high prevalence of this filarial is not indicative of low ivermectin coverage in the onchocerciasis control programme.

*Loa loa* is also present but just in four individuals (0.7%), three of them in Baney district, at the southeast of the island where the presence of *Chrysops spp.* (Diptera: Tabanidae) vector of loasis is more prevalent (Cheke et al., 2003). Data of Loasis prevalence from the Onchocercosis control programme of Equatorial Guinea obtained in 2003 indicate that *Loa loa* was present in the 24% of inhabitants of the rural part of

the continental region while in the Bioko Island was only 5%. In this report the prevalence does not reach the 1%. Loiasis has for long been regarded as a more or less benign filariasis, and has been relatively little studied in most countries, including Equatorial Guinea. Interest in Loiasis has increased in the last years due to the description of several cases of encephalopathy in countries and patients with very high, coincident, *L. loa* microfilaraemia, who had been given ivermectin treatment for onchocerciasis (Molyneux et al., 2014). The low prevalence of *L. loa* in the Bioko Island indicates that it is not a problem to carry out mass treatment with ivermectin. Also, during those years where the program has been in operation, adverse effects cases have not been reported.

Since community treatment with Ivermectine started in 1998 in Bioko Island, regular epidemiological evaluations have been performed based on parasitological tests performed in sentinel selected sites under the APOC umbrella. On the other hand this study, performed also in collaboration with the Onchocerciasis control programme of Equatorial Guinea, was carried out in no sentinel communities and using molecular approach to the epidemiological filarial analysis. The conclusion of the study suggests that onchocerciasis is moving fast towards elimination after more than 16 years of ivermectine distribution and that results in this report show only a case of *O. volvulus* and two of *M. streptocerca*, which can be used as an indicator of ivermectin coverage. Those data suggest the possibility to interrupt ivermectin distribution in the near future, even more as the vector onchocerciasis on the island, *Simulium damnosum*, was eliminated in 2005 and an expected reintroduction has not yet occurred.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Special thanks to Dr. Rogelio López-Vélez for his collegiality and for his donation of a *M. streptocerca* glass slide kept for nearly 30 years.

## REFERENCES

- Alonso LM. Psycho-social and economic evaluation of onchocerciasis: a literature review. Soc Med. 2009;4(1):8–31..
- Boatin, B. A.; Richards, F. O., Jr. Control of Onchocerciasis. Adv. Parasitol 2006, 61, 349-394.
- Bregani ER, Tantardini F, Rovellini A. [Mansonella perstans filariasis. Parassitologia. 2007 Jun;49(1-2):23-6.
- Cheke RA, Mas J, Chainey JE. Potential vectors of loiasis and other tabanids on the island of Bioko, Equatorial Guinea. Med Vet Entomol. 2003 Jun;17(2):221-3.
- Cuello MR, Cuadros EN, Claros AM, Hortelano MG, Fontelos PM, Peña MJ. Filarial infestation in patients emanating from endemic area. 14 cases series presentation. An Pediatr (Barc). 2009 Sep;71(3):189-95.
- Cupp, E. W.; Sauerbrey, M.; Richards, F. Elimination of Human Onchocerciasis: History of Progress and Current Feasibility Using Ivermectin (Mectizan((R))) Monotherapy. Acta Trop 2011, 120 Suppl 1, S100-S108.
- Duke BO, Moore PJ, Vincelette J 1975. Factors influencing the passage of *Onchocerca volvulus* microfilariae into the urine. Tropenmed Parasitol 26: 449-468.
- Dunn C, Callahan K, Katabarwa M, Richards F, Hopkins D, Withers PC Jr, Buyon LE, McFarland D. The Contributions of Onchocerciasis Control and Elimination Programs toward the Achievement of the Millennium Development Goals. PLoS Negl Trop Dis. 2015 May 21;9(5):e0003703.
- El Haouri M, Erragragui Y, Sbair M, Alioua Z, Louzi, El Mellouki W, Sedrati O. Cutaneous filariasis *Loa Loa*: 26 moroccan cases of importation. Ann Dermatol Venereol. 2001 Sep;128(8-9):899-902.
- Ewert A, Smith JH, Corredor A 1981. Microfilariae of *Mansonella ozzardi* in human skin biopsies. Am J Trop Med Hyg 30: 988-991.
- Fink DL, Kamgno J, Nutman TB. Rapid molecular assays for specific detection and quantitation of *Loa loa* microfilaremia. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Aug;5(8):e1299.

Fischer, P.; Buttner, D. W.; Bamuhiiga, J.; Williams, S. A. Detection of the Filarial Parasite *Mansonella Streptocerca* in Skin Biopsies by a Nested Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, 58, 816-820.

Fischer P, Tukesiga E, Büttner DW. Long-term suppression of *Mansonella streptocerca* microfilariae after treatment with ivermectin. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1403-5.

Fuglsang H, Anderson J 1974. Microfilariae of *Onchocerca volvulus* in blood and urine before, during and after treatment with diethylcarbamazine. *J Helminthol* 48: 93-97.

Fux CA, Chappuis B, Holzer B, Aebi C, Bordmann G, Marti H, Hatz C. *Mansonella perstans* causing symptomatic hypereosinophilia in a missionary family. *Travel Med Infect Dis.* 2006 Sep;4(5):275-80. Epub 2005 Oct 25.

Gardon, J.; Gardon-Wendel, N.; Demanga, N.; Kamgno, J.; Chippaux, J. P.; Boussinesq, M. Serious Reactions After Mass Treatment of Onchocerciasis With Ivermectin in an Area Endemic for *Loa Loa* Infection. *Lancet* 1997, 350, 18-22.

Mas J, Ascaso C, Escaramis G, Abellana R, Duran E, Sima A, Sánchez MJ, Nkogo PR, Nguema R, Untoria MD, Echeverria MA, Ardevol MM, de Jiménez Anta MT. Reduction in the prevalence and intensity of infection in *Onchocerca volvulus* microfilariae according to ethnicity and community after 8 years of ivermectin treatment on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Trop Med Int Health.* 2006 Jul;11(7):1082-91.

Mas J, Yumbe A, Solé N, Capote R, Cremades T. Prevalence, geographical distribution and clinical manifestations of onchocerciasis on the Island of Bioko (Equatorial Guinea). *Trop Med Parasitol.* 1995 Mar;46(1):13-8.

Molyneux DH, Hopkins A, Bradley MH, Kelly-Hope LA. Multidimensional complexities of filariasis control in an era of large-scale mass drug administration programmes: a can of worms. *Parasit Vectors.* 2014;7:363.

Moraes MA, Shelley AJ, Dias AP, Silva CJ 1983. The concentration of *Mansonella ozzardi* microfilariae in skin capillaries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 463-466.

Nuchprayoon, S.; Junpee, A.; Poovorawan, Y.; Scott, A. L. Detection and Differentiation of Filarial Parasites by Universal Primers and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005, 73, 895-900.

Olamiju OJ, Olamiju FO, Adeniran AA, Mba IC, Ukwunna CC, Okoronkwo C, et al. Public awareness and knowledge of neglected tropical diseases (NTDs) control activities in Abuja, Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep;8(9):e3209.

Padgett JJ, Jacobsen KH. Loiasis: African eye worm. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Oct;102(10):983-9. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.022. Epub 2008 May 7.

Rubio, J. M.; Post, R. J.; van Leeuwen, W. M.; Henry, M. C.; Lindergard, G.; Hommel, M. Alternative Polymerase Chain Reaction Method to Identify Plasmodium Species in Human Blood Samples: the Semi-Nested Multiplex Malaria PCR (SnM-PCR). *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* 2002, 96 Suppl 1, S199-S204.

Tang, T. H.; Lopez-Velez, R.; Lanza, M.; Shelley, A. J.; Rubio, J. M.; Luz, S. L. Nested PCR to Detect and Distinguish the Sympatric Filarial Species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 2010, 105, 823-828.

Thylefors, B.; Alleman, M. Towards the Elimination of Onchocerciasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2006, 100, 733-746.

Traoré S, Wilson MD, Sima A, Barro T, Diallo A, Aké A, Coulibaly S, Cheke RA, Meyer RR, Mas J, McCall PJ, Post RJ, Zouré H, Noma M, Yaméogo L, Sékétéli AV, Amazigo UV. The elimination of the onchocerciasis vector from the island of Bioko as a result of larviciding by the WHO African Programme for Onchocerciasis Control. *Acta Trop.* 2009 Sep;111(3):211-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.03.007. Epub 2009 Mar 31.

Toure, F. S.; Kassambara, L.; Williams, T.; Millet, P.; Bain, O.; Georges, A. J.; Egwang, T. G. Human Occult Loiasis: Improvement in Diagnostic Sensitivity by the Use of a Nested Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, 59, 144-149.

Vila Montlleo R. Serum filariasis due to *Loa loa* and *Mansonella perstans* in the continental area of equatorial Guinea. Preliminary results. *Med Trop (Mars)*. 1990 Oct-Dec;50(4):399-402. French.

"

"

"

Ngi gpf "qh'hi wtgu0'

Hki wtg"3/"O cr "qh'yj g'Dkqmq"Kncpf "y kj "yj g'mqecrk c'kqp"qh'yj g'y gpf "eqo o wpkkgu0'

P co g'qh'eqo o wpkkgu'p"yj g'vcdrg"30'

"

"

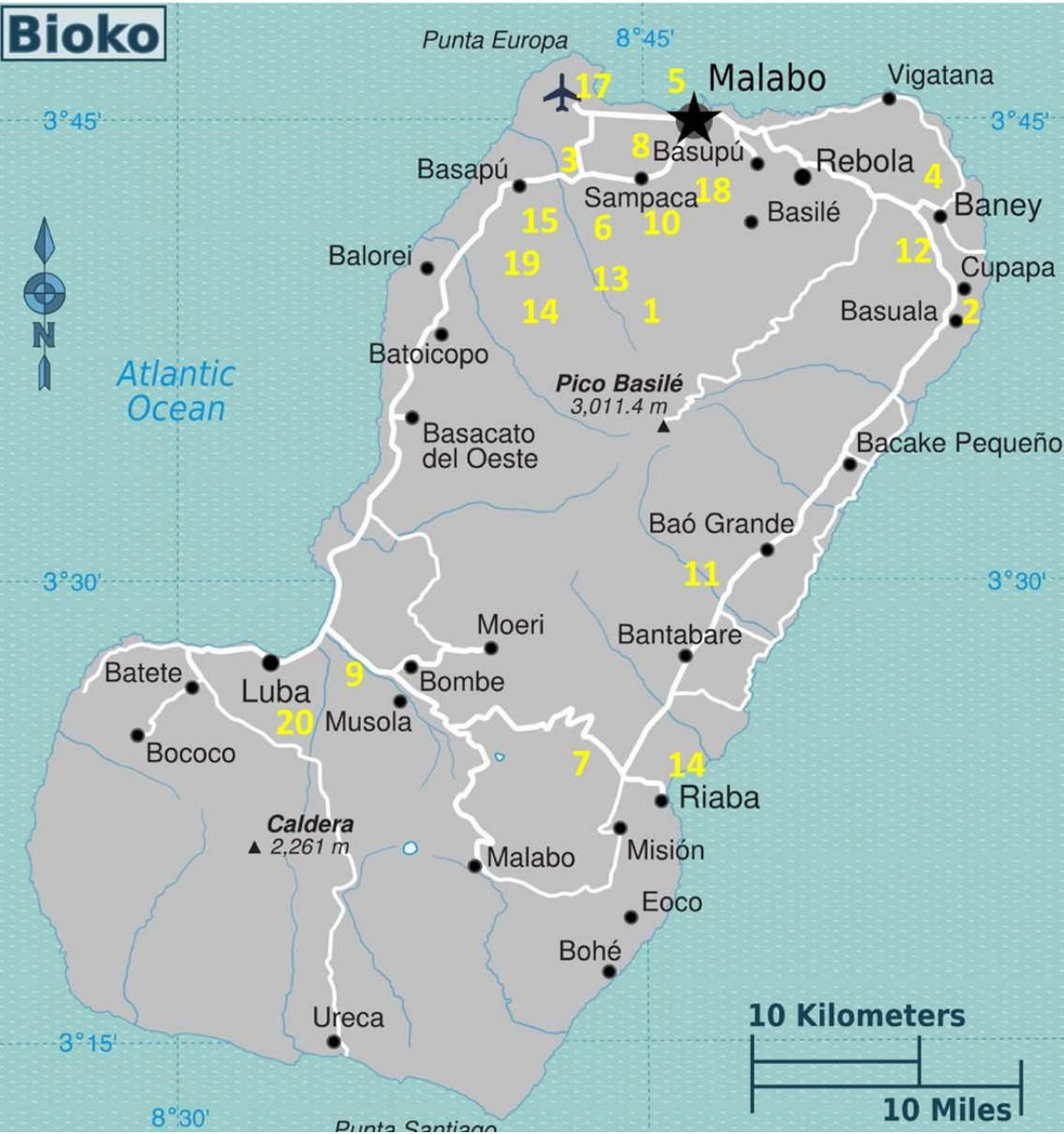
Ngi gpf "qh'vcdrgu0'

Vcdrg"30P wo dgt"cpf "pco gu'qh'yj g'eqo o wpkkgu'y j gtg'yj g'uwwf { "y cu'r gthqto gf "y kj "

pwo dgt"cpf "r gtegpvcu gu'qh'ecugu"d { "eqo o wpkkgu."ur gekgu"cpf "kuuwwgu0"

"

Figure 1. O cr "qh'v'j g'Dkqmq'Kucpf "y kj "v'j g'ncrc'k cv'kp"qh'v'j g'w gpv{ "eqo o w'pk'gu'0'  
P co g'qh'eqo o w'pk'gu'k'p"v'j g'v'cdng'30'





Community Number & Name	Number of participants	District Name: Total of positive cases (percentage)				Blood		Skin			
		Malabo (A)	Baney (B)	Luba (C)	Riaba (D)	<i>Loa loa</i>	<i>M. perstans</i>	<i>Loa loa</i>	<i>M. perstans</i>	<i>M. strptocerca</i>	<i>O. volvulus</i>
1 Santo Tomas de Aquino	12	0									
2 Zona Media B1 Baney	23		7 (21.2%)			2	5	1			
3 Manzana Casa Bola	28	1 (3.6%)					1				
4 Zona Alta A1 Baney	36		5 (13.9%)				5				
5 Alcalde 1 Malabo	28	0									
6 Cuartel de Colasesga	31	0									
7 Inasa Maule	24				11 (45.8%)	1	8			2 (2)*	
8 Manzana GETESA	32	2 (6.3%)					2				
9 Zona B Moka-Bioko	21			0							
10 IPECSA	31	0									
11 Bilelipa	25				6 (24.0%)		5		4 (1)*		
12 Zona Baja Baney	34		6 (17.6%)			1	5				
13 Santa Maria IV B	40	1 (2.5%)					1				
14 Barrios Adyacentes	21				13 (61.9%)		12		1		1 (1)*
15 Sampaka 1	38	1 (2.6%)					1				
16 Catedral Ela Nguema	0	ND									
17 Zona "D" C/1-25	19	1 (5.3%)					1				
18 Manzana Cachirulo	21	1 (4.8%)					1				
19 Santa Maria IV A	43	2 (4.7%)					1		2 (1)*		
20 Ruiché	26			0							
Total participants	543	323	103	47	70						
Number & percentage of positive cases by district		9 (2.8%)	18 (17.5%)	0 (0.0%)	30 (42.9%)						
all tissues and in blood		8 (2.5%)	18 (17.5%)	0 (0.0%)	26 (37.1%)						
Number & percentage of positive cases by species and tissue						4 (0.7%)	48 (8.8%)	1 (0.2%)	7 (1.3%)	2 (0.4%)	1 (0.2%)
Number & percentage of positive cases by districts, species and tissue			57 (10.5%)			52 (9.6%)			11 (2.0%)		

(nº)\* Positive cases detected just in skin without corresponding result in blood.

## V. DISCUSIÓN

## V. DISCUSIÓN

### 1. Enfermedades de la pobreza y enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs)

Se denominan enfermedades de la pobreza y enfermedades tropicales desatendidas o NTDs por sus siglas en inglés (Neglected Tropical Diseases) a aquellas enfermedades que afectan a las poblaciones más pobres, residentes en zonas rurales remotas, barrios suburbanos marginales o zonas de conflicto y se concentran de forma casi exclusiva en las poblaciones pobres del mundo en desarrollo, en particular en las zonas de clima tropical y subtropical. Se asocian a la insalubridad del agua, a las malas condiciones de vivienda y saneamiento y a no disponer de tratamientos adecuados por su elevado coste.

La OMS en sucesivas asambleas mundiales de la salud con la representación y aprobación de todos los gobiernos incluidos en la organización clasificó al SIDA, la tuberculosis y la malaria como las enfermedades de la pobreza y a otras diecisiete patologías como las enfermedades desatendidas u olvidadas. La lista de enfermedades que ha ido aumentando con el paso de los años incluye a dengue, rabia, el tracoma causante de ceguera, la úlcera de Buruli, las treponemosis endémicas (pian), la lepra (enfermedad de Hansen), la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), la leishmaniasis, la cisticercosis, la dracunculosis (enfermedad del gusano de Guinea), la equinococosis, las infecciones por trematodos transmitidas por los alimentos (clonorchiasis, opistorquiasis y fascioliasis), la filariasis linfática, la oncocercosis (ceguera de los ríos), la esquistosomiasis (bilharziasis) y las helmintiasis transmitidas por el suelo (gusanos intestinales).

Estas enfermedades afectan a más de mil millones de personas (OMS, mayo 2013), los pacientes suelen estar multiinfectados siendo los niños los más vulnerables. Cada año mueren o causan incapacidad permanente a millones de personas, produciendo no solo dolor físico si no estigmatización social de por vida por las graves secuelas físicas en algunos casos. Muchas de las enfermedades tropicales desatendidas pueden prevenirse, eliminarse, e incluso erradicarse si se mejora el acceso a intervenciones seguras y rentables ya existentes. Su control depende de intervenciones simples que pueden ser llevadas a cabo por personal no especializado (profesores, dirigentes de las aldeas, voluntarios locales) en acciones preventivas de base comunitaria y con medidas de control sencillas como el saneamiento de las aguas, con la distribución de tratamientos eficaces gratuitos y con métodos de diagnóstico sensible y específico.

En este trabajo se ha focalizado hacia varias de estas enfermedades desatendidas y de la pobreza, la malaria o paludismo y las filariosis incluidas las linfáticas y la oncocercosis o ceguera de los ríos. Todas estas patologías están actualmente bajo programas de control apoyados por organismos internacionales (OMS, Banco Mundial, ONU) y por grandes fundaciones (Bill & Melinda Gates, Carter Foundation, DNDi, FIND) pero ni siquiera en el caso de la malaria se cubren las necesidades para los programas de control. Los importes destinados a la lucha antipalúdica, pese a ser considerables, no alcanzan la estimación de la OMS de más de 5.000 millones de dólares necesarios para el control de la enfermedad en el periodo 2010-2015 (OMS, 2011).

Respecto a las filariosis, la oncocerciasis y las filariasis linfáticas son las dos infecciones por filarias que la OMS les dedica más atención por su morbilidad y que pretende erradicar en un futuro. Para ello se crearon programas específicos para el control y eliminación de estas parasitosis:

1. Programa de control de la oncocercosis en África del oeste (OCP: Onchocerciasis Control Programme in West Africa, 1975-2002). Programa dedicado exclusivamente al control vectorial mediante el esparcimiento semanal de larvicidas de manera aérea durante 20 años que es la vida estimada de los adultos de *O. volvulus* (Boatin y Richards, 2006).
2. Programa africano para el control de la oncocercosis (APOC: African Programme for Onchocerciasis Control, 1995-presente) y Programa de eliminación de la oncocercosis en las Américas (OEPA: Onchocerciasis Elimination Program for the Americas, 1993- presente). Son programas regionales para el control, en África, y eliminación, en América, de la oncocercosis basados principalmente en el tratamiento masivo con ivermectina en las zonas y comunidades con casos de oncocercosis (Blanks *et al.*, 1998; Remme *et al.*, 1989). Estos programas han conseguido grandes progresos en el control de la oncocercosis en los últimos 30 años, tanto por el control vectorial como por la donación gratuita de ivermectina (Mectizan®) por Merck & Co. Inc., desde 1988. Recientemente se ha conseguido bajo el programa OEPA la eliminación de los focos de oncocerca en Ecuador que ha pasado a ser país libre de la enfermedad (Lovato *et al.*, 2014).
3. Programa global para la eliminación de la filariosis linfática (GPELF: Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis, 2000- presente). El programa

utiliza como herramienta para la eliminación de filariasis linfática la administración de albendazol combinado ya sea con ivermectina o con dietilcarbamacina (DEC) (WHO, 2010). Las previsiones según el GPELF es que para el 2020 esta infección estaría eliminada. En el último informe realizado en el 2013 mostró que de los 73 países endémicos de filariasis linfática, 60 países seguían con la administración de albendazol mientras que 15 que habían conseguido interrumpir la transmisión habían detenido la administración de la droga (WHO, 2013).

El objetivo principal de cualquier programa de control de infecciones es asegurar que es real la eliminación de la infección. Para ello es necesario disponer de buenas herramientas de diagnóstico que en un entorno de baja prevalencia y baja carga parasitaria debido a la administración masivas de drogas (Mas *et al.*, 2006), a los efectos de la semi-inmunidad en el caso de malaria (Rubio *et al.*, 1999) y a la infección por zoonosis (Ta *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2014) o en la localización atípica de las microfilarias; *O. volvulus* en sangre (Duke *et al.*, 1975; Fuglsang and Anderson, 1974), *L. loa* en piel (El Haouri *et al.*, 2001), *M. ozzardi* y *M. perstans* en piel (Ewert *et al.* 1981; Moraes *et al.*, 1983, Ta Tang *et al.*, 2015) deben de ser altamente sensibles y específicas.

Las características deseables, aunque difíciles de alcanzar, que deberían cumplir estos métodos son: alta sensibilidad, métodos capaces de detectar en el caso de malaria, las infecciones asintomáticas (Monge-Maillo *et al.*, 2012) o submicroscópicas (Ramírez-Olivencia *et al.*, 2012) y en el caso de filarias aquellas infecciones amicrofilarémicos (no presencia de microfilarias en sangre por microscopía, en caso de filariasis linfática) o amicrofilaridérmicos (no microfilarias detectables en piel para el caso de oncocercosis) (Tang *et al.*, 2010).

- Alta especificidad. Métodos que eviten falsos positivos que dan lugar a la administración de tratamientos innecesarios que tienen como consecuencia la aparición de resistencias indeseadas (OMS: World malaria report 2014)
- Practicabilidad. Métodos sencillos, en sistemas cerrados que puedan ser transferidos y utilizados en zonas de bajos recursos (Castan *et al.*, 2014)
- No invasivo. Métodos que utilicen muestras poco invasivas como orina u otros fluidos para la detección de material genético o antígenos aunque no sea la localización del patógeno más común (Kast *et al.*, 2013).

- Económico. Métodos que al estar destinados para su uso en zonas endémicas o en parasitosis relacionadas con la pobreza que afectan a personas de bajos recursos deben de ser económicos para que haya un beneficio de realizar el diagnóstico frente a un tratamiento directo (OMS, 2014).
- Versatilidad. Métodos que se puedan utilizar en estudios epidemiológicos de media/gran escala en zonas de transmisión y que sean aplicables tanto a humanos como a los reservorios y a los vectores independientemente del origen o tipo de muestra.

Un buen diagnóstico es esencial para el tratamiento correcto tanto a nivel individual (malaria) como en programas de control (oncocercosis), evitando tratamientos innecesarios y la temida aparición de resistencias ante la falta de surgimiento de nuevos medicamentos (OMS, 2014). El diagnóstico, como herramienta epidemiológica, nos ayuda a conocer el impacto que las diferentes medidas de control como el tratamiento en masa o la lucha vectorial tienen sobre la transmisión y la prevalencia de una determinada patología.

También es importante investigar nuevos métodos de diagnóstico focalizados hacia el diagnóstico diferencial, por ejemplo en el caso de filarias, donde los tratamientos masivos con ivermectina frente a *O. volvulus* no se deben de usar en zonas de alta prevalencia de *L. loa* o *W. bancrofti* debido a los graves efectos que produce en los individuos infectados (Molyneux *et al.*, 2014).

## **2. Métodos de diagnóstico para las infecciones parasitarias.**

### **2.1 Métodos convencionales: microscopía, pruebas de diagnóstico rápido (RDTs) y serología.**

El método más común para el diagnóstico de malaria es el examen microscópico de extensión fina de sangre y gota gruesa teñidas con Giemsa. Sin embargo, la microscopía tiene sus limitaciones al respecto: requiere de largo tiempo, los errores en la identificación de especie son frecuentes, especialmente cuando el microscopista carece de experiencia o cuando la parasitemia es baja (entre 20-50 parásitos/ $\mu$ l de sangre o 0,0004-0,001%), tal como ocurre en portadores asintomáticos. A pesar de todo, la microscopía se sigue considerando la técnica "Gold Standard" para el diagnóstico de malaria. La sensibilidad límite de la microscopía es de 20-50 parásitos/ $\mu$ l de sangre, tal sensibilidad sólo es alcanzable cuando el microscopista es un gran experto y dispone de sangre reciente y no sangre congelada o almacenada a 4°C durante varios días. Tales condiciones no se reúnen en países donde la infección

no es endémica, el microscopista carece de esa experiencia y la sangre se tiene que transportar a los laboratorios de referencia, todo esto supone un gran reto para los laboratorios de referencia de diagnóstico de enfermedades tropicales.

En varios estudios anteriores (Stow NW, 1999; McKenzie FE, 2003; Ndao M, 2004; Nankabirwa J, 2009; Wang B, 2014) hacen comparaciones entre varios métodos de diagnóstico (microscopía vs RDTs, microscopía-RDTs-PCR) o incluso comparan microscopista experto vs microscopista no experto y las conclusiones son muy similares:

- i) la microscopía en manos de personal sin experiencia tiene poca sensibilidad y especificidad (Snounou *et al.*, 1993),
- ii) los RDTs son útiles especialmente para la determinación de *P. falciparum* pero no así del resto de especies, adoleciendo de sensibilidad y especificidad, siendo esta similar a la microscopía (Rubio *et al.*, 2001; Cuadros *et al.*, 2007).
- iii) los métodos basados en amplificación genómica, especialmente la PCR, son los que mejor resultado han dado, mostrando una mayor sensibilidad y especificidad (Rubio *et al.*, 2002, Snounou *et al.*, 1993).

La serología es un método indirecto de diagnóstico, ya que no detecta la presencia del parásito o alguno de sus componentes, sino los anticuerpos que produce el huésped frente a la invasión. Es un método poco utilizado en el diagnóstico, ya que no diferencia infecciones pasadas de actuales (Torrus *et al.*, 2015) y en primo infecciones la seroconversión puede aparecer después que los síntomas (Rubio *et al.*, 1999).

Los RDTs para la detección de antígeno proporcionan resultados rápidos, y son una buena alternativa en aquellos casos en los que un resultado fiable de la microscopía no está disponible (Torrus *et al.*, 2015, Cuadros *et al.*, 2007). Sin embargo, los RDTs dan falsos negativos en muestras con parasitemia baja y en presencia de gametocitos o esquizontes, y con parasitemia alta (>100.000 parásitos/μL) por el efecto prozona (Torrus *et al.*, 2015). Estos métodos también pueden dar falsos positivos en general con la presencia de del factor reumatoide (Grobusch *et al.*, 1999) y por la persistencia del antígeno después del tratamiento (Muñoz *et al.*, 2015 Torrus *et al.*, 2015).

En nuestros resultados el uso de la microscopía y los RDT no han sido útiles. En la confirmación del caso de la infección por *P. knowlesi* en un viajero proveniente del sudeste asiático tanto el test rápido como la microscopía, inicialmente, fueron negativos. Una vez obtenida la confirmación del caso por PCR y secuenciación del fragmento amplificado una búsqueda intensa por varios microscopistas en varias

preparaciones de la sangre original del paciente permitió observar eritrocitos infectados con el parásito pero no se pudo determinar la especie por presentar muchas similitudes morfológicas con *P. falciparum* y con *P. malariae* (Figura 5.1).

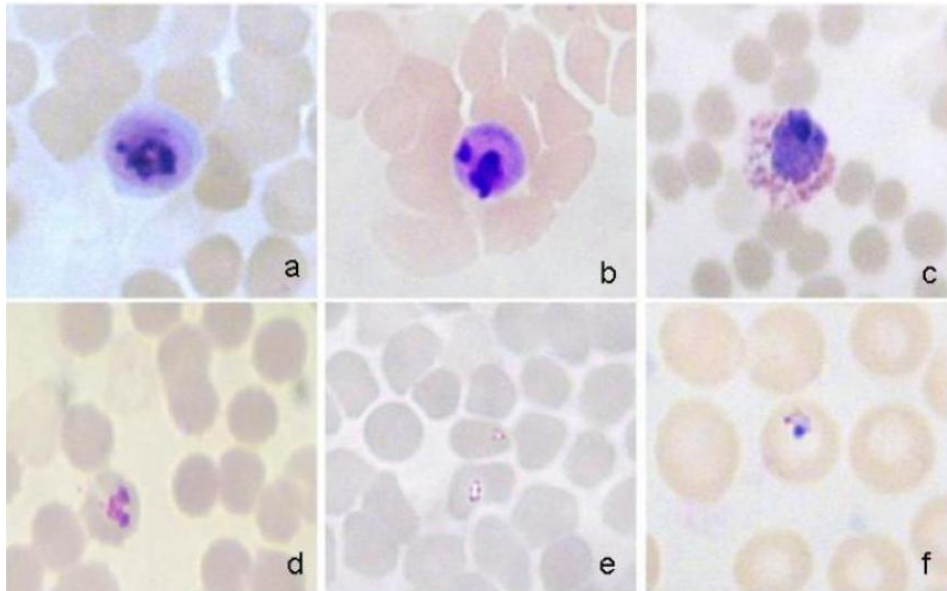


Figura 1. Extensiones de sangre teñidas con Giemsa del paciente infectado con *P. knowlesi*. a-b: trofozoitos maduros; c: gametocito; d: etapa indefinida; e-f: trofozoitos tempranos (Ta et al., 2010)

Las especies de *Plasmodium* que afectan generalmente a humanos tienen diferencias morfológicas claras que permiten su identificación microscópica, pero especies como *P. knowlesi* al compartir características comunes con algunas de ellas se confunde fácilmente. Realizando una evaluación del correcto diagnóstico por microscopía en Malasia demostraron que frecuentemente *P. knowlesi* era confundido con *P. falciparum* y *P. vivax* e indistinguible de *P. malariae*. Además observaron que sólo el 72% de las PCR positivas para *P. knowlesi* podían ser identificadas correctamente por microscopia y el 30% de *P. vivax* era identificado erróneamente como *P. malariae/P. knowlesi* (Barber et al., 2013).

La microscopía tampoco sirvió para caracterizar el primer caso descrito de malaria por *P. cynomolgi* adquirida de forma natural por un humano (Ta et al., 2014). En este caso el diagnóstico microscópico caracterizó la infección como *P. vivax* y no fue hasta la detección por amplificación genómica y la confirmación por secuenciación que se alcanzó el diagnóstico correcto de una infección por *P. cynomolgi*. La morfología de los diferentes estadios de *P. cynomolgi* y de *P. vivax* son casi idénticas, ambos parásitos se engloban filogenéticamente en el grupo de *vivax* y comparten muchas características incluidas la presencia de un estadio durmiente o hipnozoito (Figura 5.2).



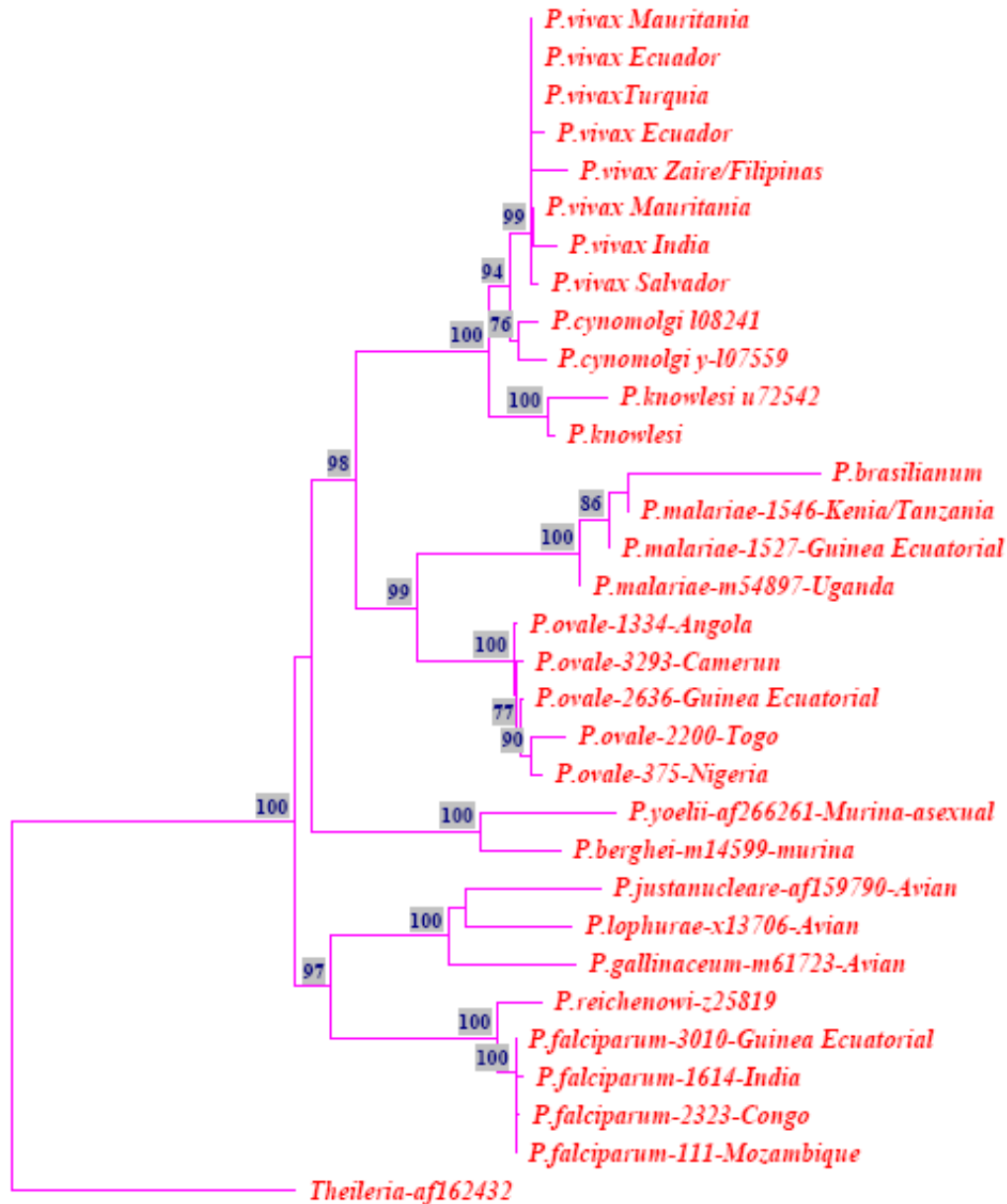


Figura 2: Árbol filogenético del género *Plasmodium* usando el método de Neighbour Joining.

Como se ve la microscopía a pesar de ser el método primario de diagnóstico y método de referencia tiene muchas limitaciones como baja sensibilidad, requiere personal con gran destreza para realizar un diagnóstico correcto y aún con un experto la especificidad es baja presentando muchas complicaciones para la identificación de las distintas especies.

Los métodos de detección de antígeno o test de inmunocromatografía de diagnóstico rápido (RDTs) son una herramienta muy útil para detectar la presencia del parásito de forma rápida (Murray y Bennett, 2009). Se basan en la detección de

antígenos del parásito, bien especie específicos; como la Proteína 2 rica en histidina (Pf-HRP-2) o la Lactato deshidrogenasa (Pf-LDH) para *P. falciparum*, o esta misma en su versión para *P. vivax* (Pv-LDH); o bien género específicos como la Aldolasa o un antígeno común de la Lactato deshidrogenasa. La mayoría de los RDTs están diseñados para detectar *P. falciparum* y el antígeno común para *Plasmodium sp.* (Wilson, 2012).

Estos test lo intenta implantar la OMS como una alternativa a la microscopía (Jeremiah *et al.*, 2014), en zonas que tienen pocos recursos, en la que los laboratorios no disponen de tecnología para realizar un diagnóstico exhaustivo de malaria y en las que esta enfermedad registra un gran número de casos diarios en la población (Murray y Bennett, 2009). *P. knowlesi* puede reaccionar con anticuerpos monoclonales dirigidos para pLDH de *P. falciparum* y *P. vivax* debido posiblemente a la elevada similitud que hay en las secuencias de aminoácidos entre estos parásitos (McCutchan *et al.*, 2008), pero no reacciona con HRP-2 ya que esta sólo está presente en *P. falciparum* (Hakimi *et al.*, 2014). En una evaluación de tres tipos de RDTs para medir la sensibilidad y especificidad para detectar *P. knowlesi* se observó que los valores de sensibilidad y especificidad eran bajos comparados con la microscopía (Foster *et al.*, 2014). Al igual que la microscopía presenta limitaciones ya que no detecta a los pacientes asintomáticos ni con bajas parasitemias. Aun así también tiene sus ventajas, siendo un método rápido, fácil de usar, versátil en los lugares de point- of- care y ventajoso en cuanto a relación coste- efectividad (Jeremiah *et al.*, 2014).

En nuestro caso los RDT no fueron capaces de detectar la infección por *P. knowlesi* en el caso importado (Ta *et al.*, 2010), pero debido a la baja carga parasitaria no podemos determinar si fue por falta de sensibilidad o de especificidad. En el caso descrito de la primera infección natural por *P. cynomolgi* (Ta *et al.*, 2014) no se pudo realizar el test rápido al no estar disponible en Kuala Lumpur.

En las infecciones por filarias el método de referencia es el diagnóstico parasitológico, es decir, la visualización macroscópica o microscópica del gusano o de la microfilaria. La microscopía permite determinar la intensidad de la infección, es específica, ya que es posible diferenciar las diferentes filarias por sus características morfológicas, pero es poco sensible en casos de baja microfilaridermia/microfilaremia o cuando es una infección temprana donde la intensidad de infección es baja o se encuentra en periodos pre-patentes. Además si consideramos que los tratamientos masivos con ivermectina producen drásticas reducciones de la carga de microfilarias

(Mas *et al.*, 2006), no solo de *O. volvulus* sino de todas las microfilarias (Ta Tang *et al.*, 2015), el diagnóstico microscópico se hace más complicado.

En Sudamérica esta complejidad es mayor. En este continente co-existen dos especies del género *Mansonella*; *M. ozzardi* (Tang *et al.*, 2010) distribuida en todas las zonas endémicas del continente y *M. perstans* (Kozek *et al.*, 1983) citado en zonas muy restringidas y en baja prevalencia, además se han caracterizado una serie de filarias con morfología atípica para la región que se han caracterizado como atypical-*M. ozzardi* (Adami *et al.*, 2008), or *Microfilaria bolivariensis* (Godoy *et al.*, 1980).

En nuestro caso, en el estudio de filariosis en Amazonas se caracterizaron varias filarias que morfológicamente se diferenciaban de la *M. ozzardi* típica que es la predominante en la zona pero también se diferenciaba de *M. perstans* que es la otra *Mansonella* descrita en la región amazónica (Figura 5.3). El estudio microscópico realizado entre siete expertos deparó curiosamente una disparidad de diagnósticos, aquellos microscopistas que estaban más acostumbrados a observar filarias procedentes de África, las caracterizaron como *M. ozzardi*, por el contrario aquellos más acostumbrados a ver *M. ozzardi* las caracterizaron como *M. perstans* (Ta Tang *et al.*, 2015a). Las técnicas de biología molecular confirmaron que las filarias atípicas descritas en nuestro trabajo se correspondían a *M. ozzardi* con una morfología modificada con respecto al modelo tipo, coincidiendo con el resultado obtenido en similares atípicas filarias en Perú (Marcos *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que la especificidad de la microscopía depende de la subjetividad del observador, de su experiencia pero también de la morfología cambiante de las propias filarias.

"

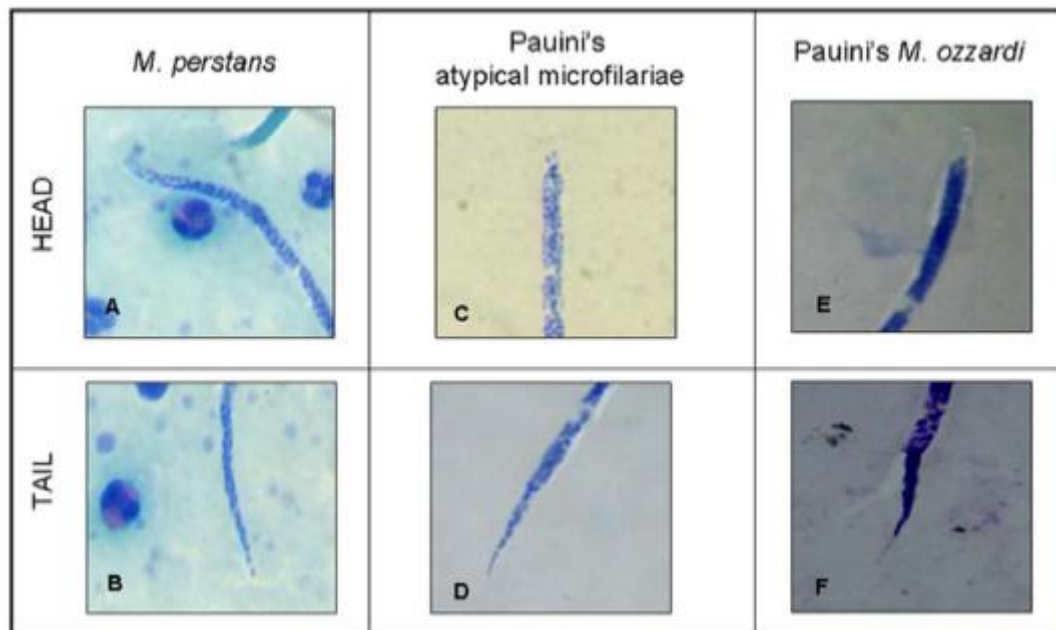


Figura 3: Extensiones de sangre teñidas con Giemsa. Comparación morfológica de cabezas y colas de microfilarias correspondientes a *M. perstans* africana (A,B), atípica microfilaria en Amazonas (C,D) y *M. ozzardi* (E,F) (Ta Tang *et al.*, 2015).

## 2.2 Métodos moleculares aplicados a malaria

La malaria en humanos está causada por la infección de uno o varias especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y ocasionalmente por otras especies de *Plasmodium* (Ta *et al.*, 2014). *P. falciparum* y *P. vivax* son las especies que causan la mayoría de la malaria a nivel mundial. *P. vivax* y *P. ovale* tienen estadios durmientes hepáticos (hipnozoitos) que producen recidivas al cabo de meses o años tras la primera picadura de un mosquito infectado. *P. malariae* puede dar lugar a infecciones de larga duración y si no se trata puede persistir de forma asintomática en el huésped humano durante años, incluso toda la vida. *P. knowlesi* es un protozoo que causa malaria en simios y está reconocido recientemente como la quinta especie de plasmodio que causa malaria en humanos (Azira *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2004; Subbarao, 2011) y del que se han documentado casos fatales en el Sudeste Asiático por hiperparasitemia (Cox-Singh *et al.*, 2010; Singh & Daneshvar, 2010; William *et al.*, 2011) y en casos importados en zonas no endémicas (Müller *et al.*, 2014).

Alrededor de 3.200 millones de personas (la mitad de la población mundial) están expuestas al paludismo. En 2013 hubo unos 198 millones de casos de la

enfermedad que, según las estimaciones, costaron la vida a 584.000 personas (OMS, 2014).

Los habitantes de los países más pobres son los más vulnerables a la enfermedad. Un 90% de todas las muertes por paludismo registradas en 2013 se produjeron en la Región de África de la OMS y afectaron mayoritariamente a niños menores de cinco años (OMS, abril 2015).

Debido a que es difícil establecer un diagnóstico certero basado en la microscopía (baja sensibilidad y especificidad, laborioso, requiere de largo tiempo para su ejecución, necesidad de microscopista experto...) se ha visto la necesidad de buscar un método de diagnóstico molecular seguro, sensible y específico, como la PCR.

En la actualidad se usa ampliamente un método de PCR de dos PCRs encadenadas (nested-PCR) para detectar las 5 especies de malaria humana (Singh *et al.*, 2004) modificado del desarrollado por Georges Snounou en 1996 (Snounou *et al.*, 1996). El mayor inconveniente de este método es que el segundo proceso de amplificación consiste en seis PCRs independientes, una por cada especie de *Plasmodium* humanos y otra para amplificar el género *Plasmodium* con el consiguiente incremento en el tiempo de diagnóstico y en el coste del mismo. Además aumentan las posibilidades de contaminación y obtener falsos positivos.

El método de referencia aplicado en el Laboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes que actúa como laboratorio de referencia de malaria para el Sistema Nacional de Salud, la Nested-Multiplex Malaria PCR (Rubio *et al.*, 2002; Ta *et al.*, 2014) no es capaz de detectar *P. knowlesi* ni cualquier otra malaria que no sea las cuatro especies más comunes. Además es un método basado en una doble amplificación y posterior electroforesis de ácidos nucleicos con lo que el tiempo de diagnóstico es excesivo, aunque en este caso el segundo proceso de amplificación es único con múltiples cebadores para la amplificación de todos los plasmodios humanos en un único proceso.

La PCR en tiempo real surgió en el año 2001 (Hermesen *et al.*, 2001) y tiene una serie de ventajas respecto a la PCR convencional: método más automatizado, sin muchos pasos complejos, sin requerimiento de técnicos muy cualificados, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado reduciendo las posibles contaminaciones y mejorando el tiempo de diagnóstico (Gama *et al.*, 2007). Una última ventaja y muy importante es la cuantificación del ADN. Mediante detección por fluorescencia se puede cuantificar el ADN presente en una muestra, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, y éste a su vez es

proporcional a la cantidad de ADN inicial. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). La cuantificación de una muestra clínica es importante para estimar pronóstico clínico y monitorización de la respuesta al tratamiento, particularmente en áreas donde se conoce resistencia a los antimaláricos.

En los países endémicos, los habitantes llegan a alcanzar un estado de premunidad, es decir, un estado capaz de controlar la parasitemia pero incapaz de eliminar del todo los parásitos de la circulación. Como resultado, estos individuos son portadores asintomáticos, actúan como reservorios porque pueden infectar a los vectores mosquitos y reintroducir la malaria en ciertas regiones (Vinetz & Gilman, 2002; Alves *et al.*, 2005). Esto puede tener un considerable impacto en el control de la malaria.

Todo diseño de un método de diagnóstico conlleva una serie de pasos, i) diseño; ii) optimización; iii) validación, y iv) determinación de la sensibilidad y especificidad. La RT-Malaria-PCR diseñada en esta Tesis está basada en el primer proceso de amplificación de la Nested Multiplex Malaria PCR (Rubio *et al.*, 2002) usando como diana la subunidad pequeña del ARN ribosómico. Se diseñó un sistema mixto de detección utilizando un agente intercalante (Eva Green I) y tres sondas de hidrólisis (sondas Taqman) como agentes de detección específicos; una sonda específica del género *Plasmodium* y dos sondas específicas de especie para *P. falciparum* y *P. vivax*. Se escogieron estas especies por ser las de mayor prevalencia y distribución con el 50% y 40-45% respectivamente frente a 5% y 7% de *P. ovale* y *P. malariae* respectivamente.

Este sistema nos permitía tener una alta especificidad por las sondas, y en paralelo con el Eva Green I podíamos calcular la temperatura de desnaturalización del fragmento ( $T_m$ ) que es constante para el género *Plasmodium* ( $84,5 \pm 0,25^\circ\text{C}$ ) obteniéndose así una confirmación diagnóstica del resultado obtenido con las sondas específicas. Con la sonda del género *Plasmodium sp.* podemos detectar un amplio rango de parásitos de malaria, tanto los causantes de infección en humanos como cualquier otro tipo de plasmodio no humano.

La RT-PCR se diseñó para el equipo Rotor Gene 6000 (Corbett) que tiene cinco filtros de fluorescencia más un filtro añadido para HRM (High Resolution Melting). Los espectros de absorción y emisión de cada una de las sondas se escogieron para que no interfirieran entre sí (NewPLF2S3 -canal rojo-excitación/emisión 650/670 nm; FALforwC-canal naranja-excitación/emisión 585/605 nm; VIV2Fc-canal crimson (carmesí)-excitación/emisión 685/712 nm). La emisión de fluorescencia del Eva Green I en el canal verde (excitación/emisión 430/510 nm) tampoco interfiere con los filtros de

las sondas pero para evitar esta posibilidad el canal amarillo no se utilizó ya que la fluorescencia emitida por el Eva Green de alta intensidad puede dar una pequeña señal de fluorescencia en ese canal.

El proceso de optimización del método es esencial para obtener una elevada sensibilidad y especificidad, en nuestro caso el aumento de la concentración de los cebadores PLF/REV (de 0,1  $\mu$ M a 1  $\mu$ M) permitió incrementar la sensibilidad alcanzando valores cercanos al método de referencia, fue la modificación más importante. La temperatura de hibridación se consiguió mantenerlo a 62°C, igual que en la PCR convencional.

Se llegó a una sensibilidad de 0,1 parásitos/ $\mu$ l (0,000002%), 1000 veces mayor que la microscopía que es de 100 parásitos/ $\mu$ l y sólo en manos muy expertas alcanza los 5 parásitos/ $\mu$ l (Moody, 2002; Ohrt *et al.*, 2008; Torrus *et al.*, 2015; Muñoz *et al.*, 2015) pero ligeramente inferior a la sensibilidad de 0,01 parásitos/ $\mu$ l) de la técnica de referencia (Rubio *et al.*, 2002).

Otra gran ventaja de este método es su capacidad para detectar tanto especies de *Plasmodium* humanos como no humanos debido a los primers género-específico y sonda género-específico que hibrida con cualquier amplicón de parásitos de malaria humano y no humano. Así es como de forma casual, durante la validación del método, detectamos e identificamos el primer caso de *P. knowlesi* en España (Ta *et al.*, 2010). La PCR de referencia del laboratorio fue negativa y al no haberse observado formas parasitarias en un principio en la microscopía esta muestra hubiera sido considerada negativa. Los clínicos no sospecharon tampoco de malaria porque el examen microscópico realizado en el hospital fue negativo y porque el paciente tomó profilaxis (primero mefloquina y después Malarone® aunque sólo cumplió el 80% de la profilaxis). Sospecharon principalmente de alguna infección vírica. Sólo la Malaria RT-qPCR fue capaz de llegar al diagnóstico definitivo y certero. Este resultado muestra la necesidad de desarrollar métodos diagnósticos abiertos que permitan la identificación de parásitos no esperados, en este caso un *Plasmodium* no característico de humanos.

La Nested Multiplex PCR también posee la capacidad de identificar cualquier *Plasmodium* pero solo cuando hay una alta parasitemia (>3%) que no fue el caso de esta malaria importada de *P. knowlesi* (Ta *et al.*, 2010), pero sí que identificó una infección por *Plasmodium spp.* en una mujer malaya. En este caso se estaba realizando un test de comparación entre las técnicas de amplificación genómica de ambos laboratorios Singh *et al.*, (2004) en Malasia y la Nested Malaria PCR (Rubio *et al.*, 2002) en Madrid. En Malasia la muestra fue caracterizada como *P. vivax*, mientras

que en Madrid solo se obtuvo el fragmento de *Plasmodium spp* pero ningún resultado en la segunda amplificación. La secuenciación del fragmento obtenido confirmó que la muestra no se correspondía a un *P. vivax* si no a un *P. cynomolgi*. Un análisis exhaustivo de los cebadores diseñados por Snounou mostraron que los cebadores específicos para *P. vivax* mostraban una alta homología con *P. cynomolgi* y que a la temperatura de alineamiento que se utiliza era muy posible que se pudiera producir amplificaciones cruzadas (Ta *et al.*, 2014).

Este problema de diseño de cebadores también ocurría con los cebadores específicos Pmk8 y Pmk9 diseñados por Singh *et al.*, 2004 para *P. knowlesi* comprobándose que presentaban reacciones cruzadas con *P. vivax* (Imwong *et al.*, 2009; Van den Eede *et al.*, 2009; Sulistyaningsih *et al.*, 2010) pero también con *P. cynomolgi*, *P. inui*, *P. coatneyi* y *P. hylobati* (Lucchi *et al.*, 2012). En el diseño de cualquier método de amplificación genómica es muy importante comprobar que el diseño de los cebadores es tan específico como se ha decidido en el diseño original evitando posibles reacciones cruzadas no deseadas que puede dar lugar a diagnósticos incorrectos.

### 2.3 Métodos moleculares aplicados a filariosis humana

Las filarias son gusanos redondos (nematodos) que pertenecen al **Filum Nematoda, Orden Spirurida, Superfamilia Filarioidea, Familia Onchocercidae** que son transmitidos en forma de microfilaria (larva infectiva L3) a los vertebrados por un vector artrópodo, que pueden ser mosquitos (*Culicoides*, *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* y *Mansonia*), moscas (*Simulium*) o tábanos (*Chrysops*) (Murray *et al.*, 2009; Cross, 1996; Nanduri & Kazura, 1989).

Las filarias humanas causan diversas patologías entre las que se incluyen: filariasis linfática (*W. bancrofti*, *B. malayi* y *B. timori*) (Mondal 2010; Mendoza *et al.*, 2009), oncocercosis o ceguera de los ríos (*O. volvulus*) (Post, 2003) y loasis (*L. loa*) (Gil-Setas *et al.*, 2010). Hay otras especies de filarias que también parasitan al ser humano pero son de dudosa patogenicidad (*M. perstans*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca*) (Simonsen *et al.*, 2011; Bregani *et al.*, 2003; Nathan *et al.*, 1978). Ocasionalmente *Dirofilaria immitis* y *Dirofilaria repens* (filarias de perros) parasitan humanos (nódulos en tejido subcutáneo, músculos y vísceras) pero no producen microfilarias en él (Taylor, 2002; Walther & Muller, 2003).

La detección e identificación de nematodos se hacen frecuentemente basándose en la diferenciación de las características morfológicas de las microfilarias en sangre o piel (Post *et al.*, 2003; Cross, 1996); en otras ocasiones es por los efectos



patológicos que producen, su forma de transmisión o por su origen geográfico. Es conocido que la microscopía es ardua, tediosa, poco fidedigna, lenta y nada objetiva, además de requerir expertos microscopistas que sepan diferenciar en algunas ocasiones aquellas filarias que coexisten en una región, colonizan los mismos tejidos (Ewert *et al.*, 1981) o son transmitidos por los mismos vectores (Eberhard & Lammie, 1991; Shelley & Coscarón, 2001).

Ante las limitaciones de la microscopía tradicional, se desarrollaron otros métodos de diagnóstico como la serología o la detección antigénica, con unos niveles de eficacia muy variables (Shelley *et al.*, 2001; Touré *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2000) y que en ocasiones producen reacciones cruzadas, como por ejemplo *M. ozzardi* con *O. volvulus* en Brasil (Shelley *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 2014).

Las técnicas basadas en la detección de los ácidos nucleicos son una poderosa herramienta para el diagnóstico de las infecciones parasitarias como vimos previamente para el diagnóstico de malaria (Rubio *et al.*, 2002). En el caso del diagnóstico de filarias también se ha visto una mejora en la sensibilidad del diagnóstico (Nuchprayoon *et al.*, 2005). Se han desarrollado numerosos métodos de PCRs para el diagnóstico de filarias, la mayoría de ellos usan como diana ADN repetitivo, como el ADN ribosomal (Fischer *et al.*, 1998; Morales-Hojas R *et al.*, 2001; Gasser, 2006). Igualmente se han usado como dianas genes específicos de nematodos como la Proteína Mayor del Esperma (MSP, Major Sperm Protein) (Hojas & Post, 2000) o la secuencia repetitiva de 150 nucleótidos (O-150) de *O. volvulus* (Meredith *et al.*, 1991; Zimmerman *et al.*, 1994), este último ha demostrado tener reacciones cruzadas con otras especies de filarias requiriendo el uso de una sonda especie-específica (Maia-Herzog *et al.*, 1999).

Algunas de estas técnicas han sido probadas y validadas tanto en el huésped humano como en el vector (Ramzy, 2002). El mayor inconveniente es que la mayoría se han diseñado para la detección monoespecífica (Fischer *et al.*, 1998) o en otros casos requieren de pasos adicionales de digestión enzimática para la diferenciación de especies (Jiménez *et al.*, 2011)

En este trabajo se ha desarrollado una nested PCR (Tang *et al.*, 2010) para la identificación diferencial de cualquier filaria por el tamaño de fragmento amplificado (Figura 5.4)

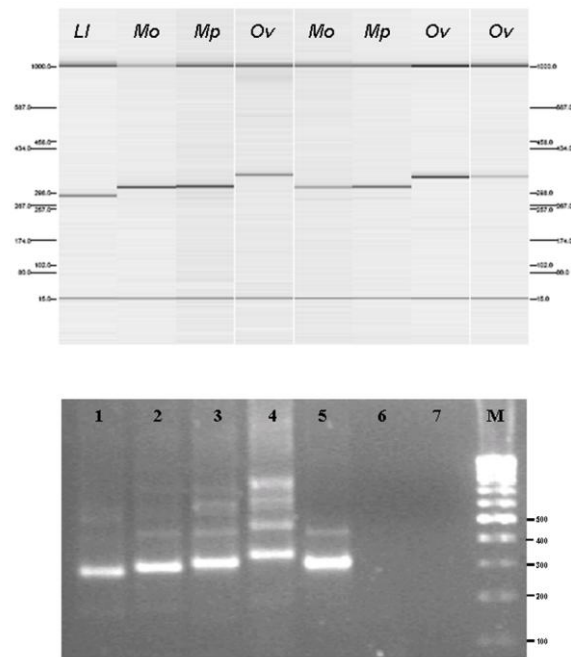


Figure 4. Productos de amplificación de la Nested PCR para filarias. a) Electroforesis en Sistema Automático QIAxcel; LI = *Loa loa*, Mo = *M. ozzardi*, Mp = *M. perstans*, Ov = *O. volvulus*. b) Electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Línea 1: *Loa loa*; Línea 2: *Wuchereria bancrofti*; Línea 3: *Mansonella perstans*; Línea 4: *Onchocerca volvulus*; Línea 5: *Mansonella ozzardi*; Línea 6: muestra filaria negativa sample; Línea 7: No ADN; M: Marcador de tamaño molecular de 100 bp (Tang *et al.*, 2010).

Nuestro propósito era diseñar un método capaz de diagnosticar infecciones causadas por filarias, y como ya hay casos descritos de filarias de perros o gatos en humanos (Teerthanath & Hariprasad, 2011; Tan *et al.*, 2011), nos centramos que fuera capaz no sólo de detectar filarias humanas, sino también filarias de animales. Por eso, en nuestro alineamiento de secuencias del gen ribosomal para el diseño de cebadores, se encuentran también las filarias que normalmente infectan a perros (*D. immitis* o *D. repens*) y gatos (*B. pahangi*).

Esta PCR está diseñada para amplificar la zona ITS1 (internal transcriber spacers: espaciador interno transcribible) del gen ribosomal de las especies de filarias, humanas y no humanas. El tamaño de esta región varía según de qué especie se trate, así los tamaños que se obtienen en la segunda PCR son: *O. volvulus*-344 pb; *B. malayi*-324 pb; *B. pahangi*-321; *M. perstans*-312 pb; *M. ozzardi*-305 pb; *W. bancrofti*-301 pb; *L. loa*-286 pb.

Para *B. timori* y *Dirofilarias sp* no se conocen los tamaños porque no hay secuencias de esa región en la base de datos, y tampoco hemos tenido la oportunidad de disponer de muestras positivas a esas especies. Afortunadamente, el tamaño de *M. streptocerca* se conoce que es de 270 pb gracias al hallazgo inesperado en dos

pellizcos cutáneos de dos individuos de la Isla de Bioko (Guinea Ecuatorial). Esta secuencia está publicada en el GenBank con el siguiente número de acceso: KR868771.

Se seleccionó como diana para la amplificación genómica el gen que codifica el ARN ribosómico (rADN). Este gen está presente en todos los eucariotas y está representado en sus genomas normalmente con varias copias, lo que permite aumentar la sensibilidad de la técnica (van Eys et al., 1992; El Sayed et al., 2000; Carlton et al., 2002; Gardner et al., 2002; El Sayed et al., 2005; Ghedin et al., 2007; Carlton et al., 2008; Pain et al., 2008). Además posee la característica que las diferentes regiones o bloques en las que se divide el gen presentan tasas de mutación diferente, con lo que presenta regiones de alta, mediana y baja homología entre diferentes especies o grupos de especie, y regiones altamente conservadas, medianamente conservadas o regiones no conservadas.

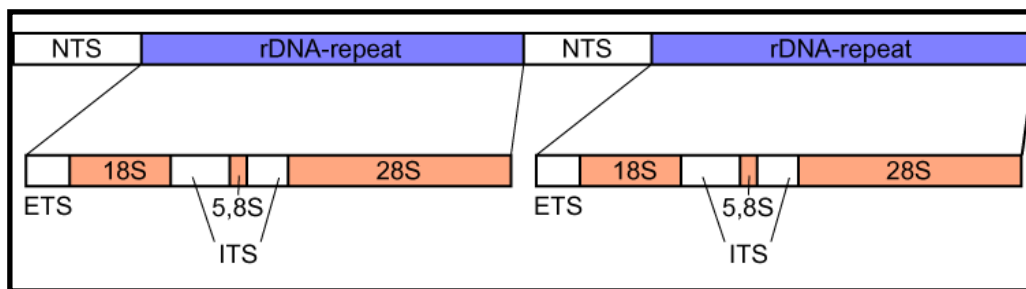


Figura 5: Disposición del ADNr eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem; el ADNr 5S se codifica separadamente. NTS: espaciador no transcribible, ETS: espaciador transcribible externo, ITS: espaciador transcribible interno. Fuente: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot\\_rdna.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png)

Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles. Las unidades de transcripción del ARN ribosómico se agrupan en tándem.

El bajo nivel de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr permite la caracterización de cada especie usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación interespecífica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución. Como resultado de ello, este ADN puede proporcionar información sobre casi cualquier nivel sistemático.

Esta dualidad de secuencias específicas y secuencias variables permite el diseño de cebadores con diversos niveles de especificidad (cebadores universales,

con especificidad de género, con especificidad de especie, etc.), lo que facilita el diseño de PCRs con alta sensibilidad y especificidad. Otra de las razones de la utilización de esta diana es que el Jefe de Grupo tiene una amplia experiencia en el diseño de métodos moleculares de diagnóstico en infecciones parasitarias basados en este mismo gen (Rubio *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002).

Se decidió diseñar una Nested PCR (PCR anidada), que consiste en dos procesos de amplificación consecutivos, donde se usa parte del producto amplificado en la primera reacción como molde para la segunda.

En teoría, una Nested PCR es un método molecular de elevada especificidad (al utilizar dos parejas de cebadores distintos en cada paso de amplificación) y sensibilidad (al contar con dos pasos de amplificación).

Las pruebas que se realizaron con muestras humanas no infestadas con filarias han mostrado que la FnPCR diseñada no produce ningún tipo de amplificación, del mismo modo cuando se han utilizado muestras humanas parasitadas con filarias tampoco se han obtenido fragmentos inespecíficos. También se ha probado en muestras humanas infestadas con otros parásitos sanguíneos tales como *Plasmodium* e igualmente no se observaron amplificaciones cruzadas. Sólo cuando se han utilizado muestras parasitadas con especies de *Onchocerca*, *Mansonella*, *Loa*, *Brugia* y *Wuchereria* se han obtenido fragmentos de amplificación cuyo tamaño se correspondía, en cada caso, con el tamaño de fragmento esperado. Para el resto de especies de filarias no se han podido hacer pruebas porque no disponíamos de muestras clínicas parasitadas, aunque por el diseño de los cebadores que están en zonas homólogas a todas las filarias, tenemos la confianza de que también serían válidos para el resto. Todas las pruebas realizadas han confirmado la alta especificidad de la PCR diseñada.

En general, los métodos de amplificación genómica o PCR para el diagnóstico de enfermedades parasitarias son más sensibles que los métodos tradicionales (Maia-Herzog *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002). La detección de microfilarias en sangre o en piel (en el caso de *O. volvulus*) son los métodos más fiables y éstos son los métodos considerados estándar durante muchos años y que siguen siendo muy utilizados en muchas regiones (Mendoza *et al.*, 2009; Molineux, 2009). Después de la colecta de sangre se usan ampliamente métodos de concentración para visualizar las microfilarias en caso de bajas microfilarecias (Palumbo, 2008).

A pesar de usar técnicas de concentración para aumentar la probabilidad de visualizar las microfilarias y así aumentar la sensibilidad de la técnica, el nivel de microfilarecia de detección mínimo es una microfilaria por mililitro (>1 microfilaria/ml). Los métodos basados en PCR tienen en teoría una sensibilidad mayor. En nuestro

caso diluciones seriadas de muestras de adultos de *O. volvulus* permitió determinar que el nivel de amplificación alcanzaba entre 0,003 y 0,005 ng/μl de ADN, que se corresponde con menos de una microfilaria (Leroy *et al.*, 2003). En el caso de *M. perstans* no se pudo determinar ni la parasitemia ni se pudo medir la cantidad de ADN de filaria en el nanodrop al tratarse de muestras humanas, lo único que se pudo realizar fueron diluciones de sangre positiva en sangre negativa de individuo sano con un nivel basal de glóbulos rojos y se comprobó que el método amplificaba hasta la dilución 1/100 de la muestra original que ya no era detectada por microscopía.

Siempre es complicado evaluar la exactitud de un método de diagnóstico, ya que cualquier evaluación significativa debe hacerse con infecciones naturales e inevitablemente implica la comparación con otros métodos de diagnóstico, que podrían ellos mismos ser erróneos. En nuestro trabajo todas las muestras infectadas naturalmente se determinaron correctamente obteniéndose el resultado esperado para las tres filarias co-endémicas de la región amazónica, *O. volvulus*, *M. ozzardi* y *M. perstans*, aunque en este último caso se utilizaron muestras procedentes de África, y las pruebas de sensibilidad fueron muy buenas por lo que se consideró que este método era válido para hacer estudios epidemiológicos en zonas endémicas y pasó a ser la técnica de referencia para el diagnóstico de filariosis en el laboratorio del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII).

Se realizó una evaluación en campo de este método en Pauini, (Amazonas, Brasil) comparándolo con la microscopía (Ta Tang *et al.*, 2015a). De las cuarenta muestras analizadas la microscopía detectó catorce positivas (35%) mientras que la PCR detectó diecinueve casos (47,5%). Por especies la microscopía caracterizó once (78,6%) como *M. ozzardi* y tres (21,4%) como atípica-*M. perstans* por cinco independientes microscopistas y como atípica-*M. ozzardi* por un único microscopista (Figura 5.3). La PCR caracterizó los 19 positivos como *M. ozzardi* por tamaño. Ante las discrepancias entre microscopía, microscopistas y PCR se secuenciaron todos los fragmentos obtenidos y además se realizó una segunda PCR basada en la proteína mayor del esperma (Hojas & Post, 2000). Ambas pruebas confirmaron que todas las muestras caracterizadas positivas por la PCR de filarias se correspondían a *M. ozzardi*. Como vimos previamente la caracterización morfológica aunque existen guías y caracteres específicos que permiten diferenciar especies de filarias en ocasiones estas características son solapantes cuando se estudian otras poblaciones. Los resultados obtenidos confirmaron la sensibilidad del método y también la especificidad frente a la microscopía. Por último esos resultados nos hicieron proponer que la presencia de *M. perstans* en el continente americano es dudosa y se deberían hacer

estudios utilizando métodos de caracterización molecular para determinar correctamente su distribución.

En teoría la PCR diseñada era capaz de detectar los cinco grupos de filarias que afectan a humanos (*W. bancrofti*, *Brugia spp.*, *L. loa*, *O. volvulus* y *Mansonella spp.*) pero al utilizar muestras procedentes de África la detección de *L. loa* no era eficiente comparándola con el resto. En principio consideramos que la presencia de vaina fuera un impedimento para una correcta extracción del ADN (Nanduri & Kazura, 1989) pero la obtención de resultados positivos utilizando una PCR específica para la amplificación de *L. loa* (Touré *et al.*, 1999) nos confirmó que posiblemente había un problema en el diseño de los cebadores en especial el ITS-1F.

Un nuevo alineamiento de las secuencias de filarias incorporadas recientemente a la base de datos (Figura 5.6) nos permitió diseñar un nuevo cebador que fuera homólogo con las secuencias de *Loa* y *Wuchereria*.

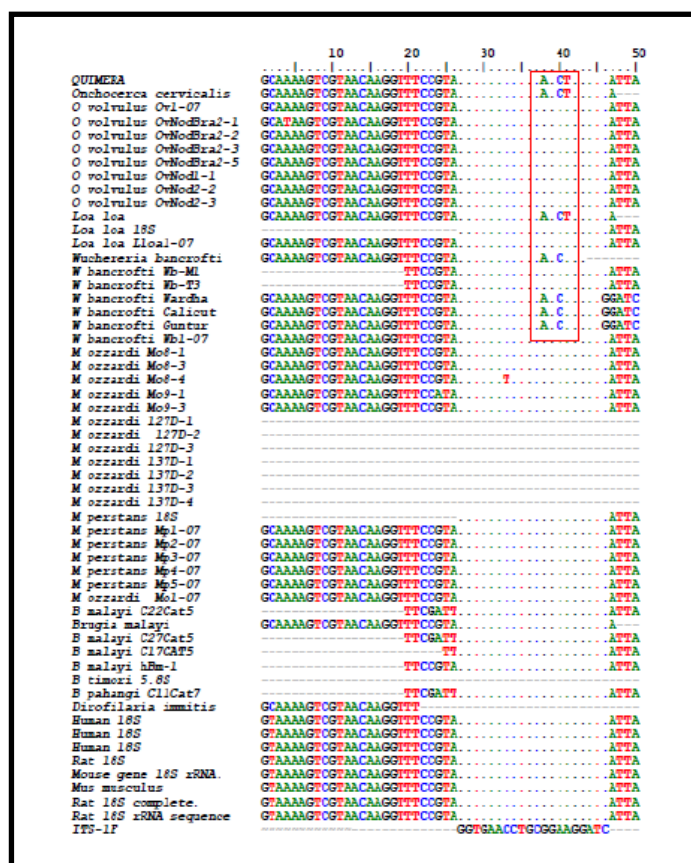


Figura 6. Alineamiento de la zona del cebador ITS-1F con las mutaciones en algunas secuencias de *Loa* y *Wuchereria*.

Los experimentos realizados con este nuevo cebador directo para la segunda ronda de la FnPCR resultaron muy satisfactorios amplificándose todas aquellas

muestras positivas a *L. loa*, bien por microscopía o bien por la PCR de Touré *et al.*, (1999).

La PCR de filarias diseñada cumplía muchos de las “características deseables” que se le piden a los nuevos métodos de diagnóstico:

- Alta sensibilidad y especificidad. La comparación frente a la microscopía ha demostrado una mayor sensibilidad (35% frente a 47% de casos detectados) y una mayor especificidad (descarta la presencia de filarias atípicas).

- No invasivo. La detección en sangre se puede hacer en punción del dedo (< 200 µl) sin necesidad de extracciones de volúmenes de sangre (> 1ml) y en el caso de la detección de *O. volvulus* la mayor sensibilidad permite utilizar uno o dos únicos pellizcos de piel en lugar de los cuatro recomendados.

- Económico. El método como todos los métodos de amplificación genómica es mucho más caro que los métodos microscópicos pero al ser un método de detección múltiple simplifica el coste y el tiempo de personal.

- Versatilidad. El método se ha aplicado en vectores para la detección de larvas de filarias en Amazonas con muy buenos resultados (Sergio Luz, Director del Centro de pesquisas Leonidas e Marie Deane. FIOCRUZ Amazonas, comunicación personal).

Recientemente se ha realizado una modificación de este método para adaptarlo a PCR en tiempo real. El método previamente validado en el laboratorio con muy buenos resultados, se ha utilizado en un estudio de prevalencia de onchocercosis en la Isla de Bioko, antigua Fernando Poo (Guinea Ecuatorial).

En esta isla los sucesivos programas de control (OCP: Programa de control de la oncocercosis; APOC: Programa de control de la oncocercosis en África) activos desde 1987 y 1998 respectivamente (Mas *et al.*, 2006) han conseguido reducciones de la prevalencia muy importantes mediante el control vectorial y más recientemente por el tratamiento masivo con ivermectina a las poblaciones de mayor riesgo. El éxito de estos programas se ve reflejado en una reducción desde el 74,5% al 38,4% de la prevalencia de oncocercosis en la isla entre los años 1998 al 2006 (Mas *et al.*, 2006). Es de esperar que gracias al tratamiento prolongado durante más de quince años se haya conseguido interrumpir la transmisión (Dunn *et al.*, 2015) especialmente desde la eliminación del vector en la isla en 2005 (Traore *et al.*, 2009). El objeto del trabajo fue realizar un estudio prospectivo para determinar la prevalencia de *O. volvulus* y otras filarias en poblaciones de la isla no centinelas para el APOC. Los resultados mostraron que mientras la microscopía no detectaba ninguna filaria en piel la RT-PCR de filarias detectaba once casos, de los cuales uno era debido a *O. volvulus* en una persona que nunca había tomado ivermectina. El resto de casos fueron dos por *M. streptocerca*, un

caso de *L. loa* y siete casos de *M. perstans*. Estos resultados confirmaron la mayor sensibilidad de la RT-PCR frente a la microscopía.

En este trabajo es interesante señalar la caracterización de filarias en piel siendo en los casos de *L. loa* y *M. perstans* una localización atípica. Se podría pensar que al obtener la muestra mediante biopsia de piel, ésta se podría haber contaminado con sangre pero en dos casos la sangre del mismo individuo no presenta microfilarias de la misma especie. Descripción de casos de filarias en localizaciones atípicas existen en la literatura, *O. volvulus* ha sido encontrada en sangre (Duke *et al.* 1975; Fuglsang & Anderson, 1974), *L. loa* ha sido localizada en piel (El Haouri *et al.*, 2001) y *M. ozzardi* ha sido también localizada en piel (Ewert *et al.* 1981, Moraes *et al.* 1983). Estos resultados reflejan la necesidad de una identificación precisa en los estudios de prevalencia de la oncocercosis y la filariasis en general, especialmente cuando otras filarias pueden producir errores de identificación como *M. streptocerca* en Guinea Ecuatorial (Mas *et al.*, 2006) o se pueden presentar filarias en localizaciones atípicas (Tang *et al.*, 2010). En estos casos la microscopía puede causar muchos conflictos mientras que los métodos moleculares de identificación bien por PCR convencional o por Real Time PCR han mostrado una mayor precisión.

### 3. Sistemas de Análisis Múltiple para el diagnóstico clínico

En los últimos años son múltiples las nuevas metodologías que han ido surgiendo para realizar el diagnóstico e identificación de los microorganismos en los Laboratorios de Microbiología Clínica: sistemas de amplificación de ácidos nucleicos isotérmicos (LAMP: loop-mediated isothermal amplification, RCA: rolling circle amplification, SDA: strand-displacement amplification, HDA: helicase-dependent amplification, RPA: recombinase polymerase amplification, RIDA: rapid isothermal nucleic acid detection assay, NEAR: nicking enzyme amplification, y EXPAR: exponential amplification reaction) (Buchan & Ledebor, 2014; Alhassan *et al.*, 2015; Li & Macdonald, 2015); plataformas de diagnóstico molecular inmediato (point of care) (Izasa, GenDrive; Epistem); paneles multiplex para diagnóstico sindrómico (LUMINEX, MICROARRAYS); secuenciación en masa (next generation sequencing-NGS), matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF), ionización electrospray (electrospray ionization-ESI), espectrometría de masas (EM), entre otros.

Los Sistemas de Análisis Múltiple (SAM) nos permite detectar en una sola muestra múltiples patógenos asociados con ese síndrome clínico y reduciendo así el tiempo de respuesta. Permite al médico un mejor manejo terapéutico en lugar de hacer conjeturas empíricas. Estos avances tecnológicos siempre tienen como objetivo



mejorar el rendimiento del laboratorio y la eficiencia y calidad de atención hacia los pacientes. Un diagnóstico rápido y preciso tiene un impacto muy significativo en la atención al paciente: reciben el tratamiento correcto (mientras no se sepa el microorganismo etiológico se da un tratamiento paliativo empírico), permite un mejor control de la infección y reducir así la duración de la enfermedad y las secuelas asociadas a la enfermedad, así como tiempo de hospitalización, procedimientos microbiológicos innecesarios, tratamientos antibióticos inapropiados, y por último reducir todos los costes asociados.

No todo son ventajas en los SAM, también tienen sus inconvenientes. La transición desde los métodos tradicionales (microscopía, cultivo, pruebas bioquímicas,...) a la Biología Molecular (PCRs, PCR en tiempo real, espectrometría de masas,...) trae consigo la desaparición de técnicos con destreza en técnicas tan básicas como la preparación de medios de cultivo o que la automatización en los procesos disminuye el conocimiento de protocolos normalizados de trabajo para minimizar, por ejemplo, las contaminaciones. Estas tecnologías emergentes están fuera del alcance de laboratorios de países en desarrollo con escasos recursos.

Paradójicamente, también los laboratorios de países desarrollados siguen empleando esas técnicas tradicionales. ¿Cuál es/son la/s verdadera/s razón/es por el cual no se han implementado alguna de esas tecnologías emergentes? Una de ellas es la gran variabilidad y complejidad del tipo de muestras clínicas que llegan a un Laboratorio de Microbiología Clínica que determinan los procedimientos a seguir y segundo el tipo de patógeno/s que se busca/n, si son bacterias, virus, hongos o parásitos pues dependiendo del microorganismo necesita un tipo de aislamiento u otro.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como las PCRs, a pesar de su alta sensibilidad y especificidad para la identificación de microorganismos y polimorfismos genéticos, se ven muy complejas tanto en realización (se necesitan técnicos entrenados, existe la posibilidad de las contaminaciones, la elaboración de "master mixes" no siempre son fáciles) como de implementación (muchos siguen siendo PCRs caseras y no hay un método de referencia para comparar, usan reactivos difíciles de conseguir, necesitan un aislamiento del material genético...), por estos motivos no han tenido la divulgación que deberían haber tenido. Aunque el surgimiento de las PCRs en tiempo real intentó solventar algunos de los problemas de las PCRs convencionales (hay menos riesgo de contaminación, minimiza los pasos de pipeteo, no necesita una visualización post-amplificación,...) el método emplea termocicladores más costosos, polimerasas especiales, sondas...limitando así también su empleo fuera de los Centros de Referencia.

"

Conviene recordar que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos sólo confirma la presencia de la secuencia nucleotídica diana, no del microorganismo viable. Aunque no exista clínica, la detección de ADN se puede corresponder a portadores asintomáticos con muy bajo nivel de infección aunque también se puede dar el caso de contaminaciones (falsos positivos).

Otro inconveniente con que se encuentra los SAM y como ejemplo las técnicas de amplificación genómica es la validación de los métodos “caseros” frente a un método estándar de referencia. Actualmente para ciertas patologías sí que existen programas de control de calidad como en el caso de los métodos de amplificación de *Plasmodium* (Taylor *et al.*, 2014) pero no así para las filariosis.

La positividad de las PCRs u otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos depende mucho de la diana que se use y el número de copias de ésta. Para una técnica molecular puede ser positiva y para otro método molecular con otra diana en bajo número de copias ser negativo, dando lugar a “falsos positivos” que se deben contrastar con criterios clínicos o con tests de otras modalidades. Por eso siempre se habla que los resultados de los ensayos moleculares se deben interpretar en el contexto de una presentación clínica y no usarlo como una prueba confirmatoria de cura.

Visto que las técnicas de PCRs y sus variantes no han tenido la expansión esperada, y aún con el objetivo de maximizar los beneficios de los métodos moleculares, pero a la vez intentar simplificar la metodología surgieron los “métodos de amplificación isotérmicos” que incluyen el LAMP (loop-mediated isothermal amplification) y el HDA (helicase-dependent amplification). Se elimina la necesidad de usar termocicladores caros y la optimización de los ciclos de amplificación. Al reducir los costes de instrumentación es más fácil sacarlo del laboratorio molecular y acercarlo a los puntos de atención al paciente (*point of care-POC*). Las técnicas de LAMP usa de 4-6 cebadores y varios sitios de reconocimiento, en un principio es más específico que las PCRs normales que sólo usa 2 cebadores. Este aumento de especificidad, simplicidad de metodología junto a la inspección visual de los resultados (por turbidez o cambio de color) lo hace mucho más asequible para los laboratorios de bajos recursos. Una limitación importante del LAMP es que los resultados sólo pueden darse como positivo o negativo a una especie o género porque la detección está basada en la turbidez dada por los amplicones. Los fragmentos obtenidos no se pueden secuenciar y realizar estudios genéticos y filogenéticos. Por estas características no son métodos de detección múltiple.

En este trabajo se han diseñado, optimizado, validado y aplicado tanto en el laboratorio como sobre el terreno diferentes sistemas de amplificación múltiple

"

basados en nested PCR o PCR a tiempo real para la identificación de las diferentes especies de *Plasmodium* que puede infectar a humanos, incluidas especies no típicas (Ta Tang, RT-Malaria PCR, no publicado), y para la identificación de filarias tanto en piel como en sangre (Tang *et al.*, 2010). Los sistemas de análisis múltiple diseñados nos han permitido realizar diferentes estudios con muy diferentes objetivos utilizando las mismas técnicas ahorrando en material, equipos y personal, pero además nos han permitido alcanzar resultados que por otros métodos individuales hubieran sido difíciles de obtener como son:

- La detección de infecciones maláricas en humanos por plasmodios que generalmente infectan a monos (Ta *et al.*, 2010b, 2014).
- La caracterización como *Mansonella ozzardi* de una serie de filarias de morfología atípica (Ta Tang *et al.*, 2015a).
- La detección de *M. streptocerca*, *M. perstans* y *Loa loa* en piel cuando solo se esperaba *O. volvulus* (Ta Tang *et al.*, 2015b).

Además estos métodos han sido incorporados al laboratorio de malaria y otras parasitosis emergentes como métodos de referencia.



## VI. CONCLUSIONES

"  
"

## VI. CONCLUSIONES

1.- Los métodos de diagnóstico múltiples, por ejemplo, los diseñados y utilizados en este trabajo, han demostrado cumplir los criterios exigidos a cualquier nuevo método de diagnóstico; sensibilidad, especificidad, disminuir el tiempo de respuesta pero lo más importante la simplificación del diagnóstico, reducir el número de reacciones, en paralelo el coste, y poder acercarlo a las zonas endémicas en laboratorios con cierta infraestructura.

2.- La amplificación genómica por PCR a tiempo real para malaria (RT-Malaria-PCR) diseñado ha demostrado tener la suficiente sensibilidad y especificidad para su aplicación en el diagnóstico de infecciones maláricas en humanos. Su sensibilidad es de 0,1 parásitos/ $\mu$ l (0,000002%), 1000 veces mayor que la microscopía pero ligeramente inferior en sensibilidad a la técnica de referencia (Nested Multiplex Malaria PCR: 0,01 parásitos/ $\mu$ l).

3.- La RT-Malaria-PCR nos permite detectar infecciones maláricas en humanos por plasmodios que generalmente infecta a monos debido a los cebadores género-específico y sonda género-específico, gran ventaja respecto a la técnica de referencia.

4.- La amplificación genómica por Nested PCR (FnPCR) diseñado para la identificación y caracterización de las diferentes filariosis humanas cumple los requisitos de sensibilidad y especificidad, de versatilidad por ser aplicable a muestras de cualquier índole, de poca invasividad al requerir mínima cantidad de muestra y económico porque detecta simultáneamente cualquier especie de filaria.

5.- La amplificación genómica por PCR a tiempo real para la identificación y caracterización de las diferentes filariosis humanas (RT-Filaria-PCR) posee mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía. Aunque la sensibilidad es ligeramente inferior a la FnPCR, se prefiere la RT-Filaria-PCR por ser más rápida y menos laboriosa.

6.- Tanto la FnPCR como la RT-Filaria PCR permite una mejor caracterización y más precisa de las filariosis; donde para la microscopía es incertidumbre en casos de localizaciones o morfologías atípicas de filarias, la identificación tanto con la PCR convencional como en tiempo real demuestra exactitud.

## **BIBLIOGRAFÍA**

"  
"

## BIBLIOGRAFÍA

Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy RM et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. *Parasitol Res* 1999; 85(10):844-849.

Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J* 2011; 10:144.

Adami YL, Moraes MA, Lanfredi RM, Maia-Herzog M. An atypical microfilaria in blood samples from inhabitants of Brazilian Amazon. *Parasitol Res* 2008; 104(1):95-99.

Adikaram ND, De Silva NR, Fernando A, Fernando D, Lamabadasuriya S, Reid CB. Filarial antigens detected in urine using the immunochromatographic card test. *Ceylon Med J* 2006; 51(4):157-158.

Albers A, Sartono E, Wahyuni S, Yazdanbakhsh M, Maizels RM, Klarmann-Schulz U et al. Real-time PCR detection of the HhaI tandem DNA repeat in pre- and post-patent *Brugia malayi* Infections: a study in Indonesian transmigrants. *Parasit Vectors* 2014; 7:146.

Alhassan A, Li Z, Poole CB, Carlow CK. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. *Trends Parasitol* 2015; 31(8):391-400.

Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(6):641-648.

Azira NM, Zairi NZ, Amry AR, Zeehaida M. Case series of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection in a tertiary teaching hospital. *Trop Biomed* 2012; 29(3):398-404.

Azzibrouck GB, Akue JP, Lenoble DR. Production and immunological characterization of a recombinant subunit of a *Loa loa* polyprotein antigen. *Parasitology* 2010; 137(7):1119-1128.

Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Auburn S, Marfurt J et al. A prospective comparative study of *knowlesi*, *falciparum* and *vivax* malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *P. vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. *Clin Infect Dis* 2012.

Barber BE, William T, Grigg MJ, Piera K, Yeo TW, Anstey NM. Evaluation of the sensitivity of a pLDH-based and an aldolase-based Rapid Diagnostic Test for the diagnosis of uncomplicated and severe malaria caused by PCR-confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *J Clin Microbiol* 2013.

Barber BE, William T, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J* 2013; 12(1):8.

Barnadas C, Musset L, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T et al. High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax* dhfr/dhps mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(1):19-22.

Bartoloni A, Strohmeyer M, Sabatinelli G, Benucci M, Serni U, Paradisi F. False positive ParaSight-F test for malaria in patients with rheumatoid factor. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92(1):33-34.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6):1897-1900.

Benito A, Rubio JM. Usefulness of seminested polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria in Spain. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(6):1068.



"  
"

Berry A, Iriart X, Wilhelm N, Valentin A, Cassaing S, Witkowski B et al. Imported *Plasmodium knowlesi* malaria in a French tourist returning from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(4):535-538.

Bhumiratana A, Koyadun S, Suvannadabba S, Karnjanopas K, Rojanapremsuk J, Buddhirakkul P et al. Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(3):562-568.

Blanks J, Richards F, Beltran F, Collins R, Alvarez E, Zea FG et al. The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: a history of partnership. *Rev Panam Salud Publica* 1998; 3(6):367-374.

Boatin BA, Richards FO, Jr. Control of onchocerciasis. *Adv Parasitol* 2006; 61:349-394.

Bregani ER, Balzarini L, Ghiringhelli C, Tarsia P. Transfusional *Mansonella perstans* microfilariasis. *Parassitologia* 2003; 45(2):71-72.

Buchan BW, Ledebor NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory 478. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4):783-822.

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteau M, Silva JC et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii* 242. *Nature* 2002; 419(6906):512-519.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 2008; 455(7214):757-763.

Castan P, de Pablo A, Fernandez-Romero N, Rubio JM, Cobb BD, Mingorance J et al. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52(2):502-507.

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Cok J, Angulo N, Escalante H et al. Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in urine is independent of renal injury in the guinea pig model. *PLoS One* 2013; 8(3):e58480.

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Sanchez G, Valencia AE et al. Use of a novel chagas urine nanoparticle test (chunap) for diagnosis of congenital chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(10):e3211.

Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 2004; 271(1545):1251-1262.

Chandrashekar R, Ogunrinade AF, Henry RW, Lustigman S, Weil GJ. *Onchocerca volvulus*: monoclonal antibodies to immune complex-associated parasite antigens. *Exp Parasitol* 1993; 77(2):224-234.

Chandy A, Thakur AS, Singh MP, Manigauha A. A review of neglected tropical diseases: filariasis. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 4(7):581-586.

Chew CH, Lim YA, Lee PC, Mahmud R, Chua KH. A hexaplex PCR detection system for the identification of five human *Plasmodium* species with internal control. *J Clin Microbiol* 2012.

Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The primate malarias 240. Version 1.0 (original book published in 1971) ed. Atlanta, GA: 2003.

Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J* 2006; 5:121.

"  
"

Conway DJ. Molecular epidemiology of malaria. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1):188-204.

Corral RS, Altcheh J, Alexandre SR, Grinstein S, Freilij H, Katzin AM. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol 1996; 34(8):1957-1962.

Costa J. [Real-time PCR]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(5):299-304.

Coulibaly YI, Dembele B, Diallo AA, Lipner EM, Doumbia SS, Coulibaly SY et al. A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. N Engl J Med 2009; 361(15):1448-1458.

Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P et al. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. Malar J 2010; 9:10.

Cross JH. Filarial Nematodes. 1996.

Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96 Suppl 1:S185-S189.

Debrah AY, Mand S, Marfo-Debrekyei Y, Batsa L, Albers A, Specht S et al. Macrofilariocidal Activity in *Wuchereria bancrofti* after 2 Weeks Treatment with a Combination of Rifampicin plus Doxycycline. J Parasitol Res 2011; 2011:201617.

Diaz-Menendez M, Norman F, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Lopez-Velez R. [Filariasis in clinical practice]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011; 29 Suppl 5:27-37.

Divis PC, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. Malar J 2010; 9:344.

Duke BO, Moore PJ, Vincelette J. Factors influencing the passage of *Onchocerca volvulus* microfilariae into the urine. Tropenmed Parasitol 1975; 26(4):449-468.

Dunn C, Callahan K, Katarbarwa M, Richards F, Hopkins D, Withers PC, Jr. et al. The Contributions of Onchocerciasis Control and Elimination Programs toward the Achievement of the Millennium Development Goals. PLoS Negl Trop Dis 2015; 9(5):e0003703.

Eberhard ML, Lammie PJ. Laboratory diagnosis of filariasis. Clin Lab Med 1991; 11(4):977-1010.

El Haouri M, Erragragui Y, Sbair M, Alioua Z, Louzi, El Mellouki W et al. [Cutaneous filariasis *Loa Loa*: 26 moroccan cases of importation]. Ann Dermatol Venereol 2001; 128(8-9):899-902.

El Sayed NM, Hegde P, Quackenbush J, Melville SE, Donelson JE. The African trypanosome genome 243. Int J Parasitol 2000; 30(4):329-345.

El Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 2005; 309(5733):409-415.

El Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science 2005; 309(5733):404-409.

Ersfeld K. Genomes and genome projects of protozoan parasites. Curr Issues Mol Biol 2003; 5(3):61-74.

"  
"

Ewert A, Smith JH, Corredor A. Microfilariae of *Mansonella ozzardi* in human skin biopsies. Am J Trop Med Hyg 1981; 30(5):988-991.

Fink DL, Kamgno J, Nutman TB. Rapid molecular assays for specific detection and quantitation of *Loa loa* microfilaremia. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(8):e1299.

Fischer P, Buttner DW, Bamuhiiga J, Williams SA. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(6):816-820.

Foster D, Cox-Singh J, Mohamad DS, Krishna S, Chin PP, Singh B. Evaluation of three rapid diagnostic tests for the detection of human infections with *Plasmodium knowlesi*. Malar J 2014; 13:60.

Francis J, Barrett SP, Chiodini PL. Best Practice No 174. Best practice guidelines for the examination of specimens for the diagnosis of parasitic infections in routine diagnostic laboratories. J Clin Pathol 2003; 56(12):888-891.

Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J Clin Microbiol 1987; 25(1):133-137.

Fuglsang H, Anderson J. Microfilariae of *Onchocerca volvulus* in blood and urine before, during, and after treatment with diethylcarbamazine. J Helminthol 1974; 48(2):93-97.

Gama BE, Silva-Pires FE, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. Exp Parasitol 2007; 116(4):427-432.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 2002; 419(6906):498-511.

Gasser RB. Molecular technologies in parasitology, with an emphasis on genomic approaches for investigating parasitic nematodes. Parasitologia 2006; 48(1-2):9-11.

Gatti S GMBZRAGMKCBAMRMSSM, Gispi Study Group. A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101(3):195-204.

Ghedini E, Wang S, Spiro D, Caler E, Zhao Q, Crabtree J et al. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. Science 2007; 317(5845):1756-1760.

Gil-Setas A, Perez SM, Navascues A, Rodriguez EF, Cebamanos JA, Rubio MT. [*Loa loa* and *Mansonella perstans* coinfection in a patient from Guinea]. An Sist Sanit Navar 2010; 33(2):227-231.

Gillet P, Scheirlinck A, Stokx J, De Weggheleire A, Chauque HS, Canhanga OD et al. Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? Malar J 2011; 10:166.

Global Programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report on mass drug administration, 2010. Wkly Epidemiol Rec 2011; 86(35):377-388.

Godoy GA, Orihel TC, Volcan GS. *Microfilaria bolivarensis*: a new species of filaria from man in Venezuela. Am J Trop Med Hyg 1980; 29(4):545-547.

Graewe S, Rankin KE, Lehmann C, Deschermeier C, Hecht L, Froehlke U et al. Hostile takeover by *Plasmodium*: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. PLoS Pathog 2011; 7(9):e1002224.

Grigg MJ, William T, Drakeley CJ, Jelip J, von Seidlein L, Barber BE et al. Factors that are associated with the risk of acquiring *Plasmodium knowlesi* malaria in Sabah, Malaysia: a case-control study protocol. BMJ Open 2014; 4(8):e006004.

Grobusch MP, Jelinek T, Hanscheid T. False positivity of rapid antigen detection tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria: issue appears to be more complicated than presented. J Clin Microbiol 1999; 37(11):3781-3782.

Hakimi H, Kawai S, Kawazu S. Molecular epidemiology of the emerging human malaria parasite "*Plasmodium knowlesi*". Trop Parasitol 2014; 4(1):20-24.

Hall TA. Bioedit A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41:95-98.

HARDER HI, WATSON D. HUMAN FILARIASIS. IDENTIFICATION OF SPECIES ON THE BASIS OF STAINING AND OTHER MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF MICROFILARIAE. Am J Clin Pathol 1964; 42:333-339.

Harnett W, MacDonald M, Preece G, Patterson M, Parkhouse RM. Production of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of adult male *Onchocerca gibsoni*. J Parasitol 1997; 83(2):316-319.

Hermesen CC, Telgt DS, Linders EH, van de Locht LA, Eling WM, Mensink EJ et al. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. Mol Biochem Parasitol 2001; 118(2):247-251.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson D, Higgins DG and Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 2:4673-4680

Hojas RM, Post RJ. Regional genetic variation in the major sperm protein genes of *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea). Int J Parasitol 2000; 30(14):1459-1465.

Iglesias N, Subirats M, Trevisi P, Ramirez-Olivencia G, Castan P, Puente S et al. Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. Parasitol Res 2014; 113(7):2587-2591.

Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day NP, White NJ, Snounou G. Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. J Clin Microbiol 2009; 47(12):4173-4175.

Iqbal J, Sher A, Hira PR, Al Owaish R. Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. J Clin Microbiol 1999; 37(11):3644-3646.

Jelinek T, Grobusch MP, Nothdurft HD. Use of dipstick tests for the rapid diagnosis of malaria in nonimmune travelers. J Travel Med 2000; 7(4):175-179.

Jeremiah S, Janagond AB, Parija SC. Challenges in diagnosis of *Plasmodium knowlesi* infections. Trop Parasitol 2014; 4(1):25-30.

Jimenez M, Gonzalez LM, Carranza C, Bailo B, Perez-Ayala A, Muro A et al. Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. Exp Parasitol 2011; 127(1):282-286.

Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Juma DW, Blackstone GM, Marion WR et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. Malar J 2014; 13:158.

Karani M, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. Bench-scale experiments for the development of a unified loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the in vitro diagnosis of *Leishmania* species' promastigotes. Epidemiol Infect 2014; 142(8):1671-1677.

Kast K, Berens-Riha N, Zeynudin A, Abduselam N, Eshetu T, Loscher T et al. Evaluation of *Plasmodium falciparum* gametocyte detection in different patient material. Malar J 2013; 12:438.

"  
"

Keating GM. Dihydroartemisinin/Piperaquine: a review of its use in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs* 2012; 72(7):937-961.

Khairnar K, Martin D, Lau R, Ralevski F, Pillai DR. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malar J* 2009; 8:284.

Kimura E. The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: History and achievements with special reference to annual single-dose treatment with diethylcarbamazine in Samoa and Fiji. *Trop Med Health* 2011; 39(1):17-30.

Kissinger JC, Brunk BP, Crabtree J, Fraunholz MJ, Gajria B, Milgram AJ et al. The *Plasmodium* genome database. *Nature* 2002; 419(6906):490-492.

Klion AD, Raghavan N, Brindley PJ, Nutman TB. Cloning and characterization of a species-specific repetitive DNA sequence from *Loa loa*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45(2):297-305.

Kozek WJ, Eberhard ML, Raccurt C. Comparative morphology of *Mansonella ozzardi* microfilariae from Colombia and Haiti. A light microscope study. *Tropenmed Parasitol* 1983; 34(1):33-37.

Kozek WJ, Palma G, Henao A, Garcia H, Hoyos M. Filariasis in Colombia: prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (= *Dipetalonema*) *perstans* infections in the Comisaria del Guainia. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(2):379-384.

Kozek WJ, Raccurt C. Ultrastructure of *Mansonella ozzardi* microfilaria, with a comparison of the South American (simuliid-transmitted) and the Caribbean (culicoid-transmitted) forms. *Tropenmed Parasitol* 1983; 34(1):38-53.

Kubofcik J, Fink DL, Nutman TB. Identification of Wb123 as an early and specific marker of *Wuchereria bancrofti* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(12):e1930.

Laney SJ, Buttaro CJ, Visconti S, Pilote N, Ramzy RM, Weil GJ et al. A reverse transcriptase-PCR assay for detecting filarial infective larvae in mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(6):e251.

Lau AO. An overview of the *Babesia*, *Plasmodium* and *Theileria* genomes: a comparative perspective. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 164(1):1-8.

Lau YL, Fong MY, Mahmud R, Chang PY, Palaeya V, Cheong FW et al. Specific, sensitive and rapid detection of human plasmodium knowlesi infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples  
457. *Malar J* 2011; 10:197.

Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology* 2004; 129(Pt 6):677-684.

Leroy S, Duperray C, Morand S. Flow cytometry for parasite nematode genome size measurement. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 128(1):91-93.

Li J, Gutell RR, Damberger SH, Wirtz RA, Kissinger JC, Rogers MJ et al. Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *J Mol Biol* 1997; 269(2):203-213.

Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron* 2015; 64:196-211.

"  
"

Lipner EM, Dembele N, Souleymane S, Alley WS, Prevots DR, Toe L et al. Field applicability of a rapid-format anti-Ov-16 antibody test for the assessment of onchocerciasis control measures in regions of endemicity. *J Infect Dis* 2006; 194(2):216-221.

Lobos E, Weiss N, Karam M, Taylor HR, Ottesen EA, Nutman TB. An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. *Science* 1991; 251(5001):1603-1605.

Lovato R, Guevara A, Guderian R, Proano R, Unnasch T, Criollo H et al. Interruption of infection transmission in the onchocerciasis focus of Ecuador leading to the cessation of ivermectin distribution. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(5):e2821.

Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, DeBarry J, Srinivasamoorthy G, Goldman I et al. A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *PLoS One* 2012; 7(2):e31848.

Luz SL, Crainey JL, Shelley AJ, Rubio M. Outstanding insecurities concerning the use of an Ov16-based ELISA in the Amazonia onchocerciasis focus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109(4):506-508.

Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4):949-979.

Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4):949-979.

Maia-Herzog M, Shelley AJ, Bradley JE, Luna Dias AP, Calvao RH, Lowry C et al. Discovery of a new focus of human onchocerciasis in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(3):235-239.

Maltha J, Gillet P, Cnops L, van den EJ, van Esbroeck M, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests: *Plasmodium falciparum* infections with high parasite densities may generate false positive *Plasmodium vivax* pLDH lines. *Malar J* 2010; 9:198.

Marcos LA, Arrospide N, Recuenco S, Cabezas C, Weil GJ, Fischer PU. Genetic Characterization of Atypical *Mansonella (Mansonella) ozzardi* Microfilariae in Human Blood Samples from Northeastern Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(3):491-494.

Markus MB. Malaria: origin of the term "hypnozoite". *J Hist Biol* 2011; 44(4):781-786.

Marti H, Stalder C, Gonzalez IJ. Diagnostic accuracy of a LAMP kit for diagnosis of imported malaria in Switzerland. *Travel Med Infect Dis* 2015; 13(2):167-171.

Mas J, Ascaso C, Escaramis G, Abellana R, Duran E, Sima A et al. Reduction in the prevalence and intensity of infection in *Onchocerca volvulus* microfilariae according to ethnicity and community after 8 years of ivermectin treatment on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Trop Med Int Health* 2006; 11(7):1082-1091.

Matisz CE, Naidu P, Shokoples SE, Grice D, Krinke V, Brown SZ et al. Post-arrival screening for malaria in asymptomatic refugees using real-time PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(1):161-165.

Mbacham WF, Titanji VP, Thunberg L, Holmdahl R, Rubin K. A monoclonal antibody-based immunodiagnostic assay for onchocerciasis. *Trop Med Parasitol* 1992; 43(2):83-90.

McCutchan TF, Piper RC, Makler MT. Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(11):1750-1752.

"  
"

McReynolds LA, DeSimone SM, Williams SA. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(3):797-801.

Mendonca VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhaes BM, Goncalves MS, Lacerda MV et al. Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* 2015; 14(1):407.

Mendoza N, Li A, Gill A, Tying S. Filariasis: diagnosis and treatment. *Dermatol Ther* 2009; 22(6):475-490.

Mohon AN, Elahi R, Khan WA, Haque R, Sullivan DJ, Jr., Alam MS. A new visually improved and sensitive loop mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of symptomatic falciparum malaria. *Acta Trop* 2014; 134:52-57.

Molyneux DH. Filaria control and elimination: diagnostic, monitoring and surveillance needs 430. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(4):338-341.

Molyneux DH, Mitre E, Bockarie MJ, Kelly-Hope LA. Filaria zoogeography in Africa: ecology, competitive exclusion, and public health relevance. *Trends Parasitol* 2014.

Mondal SK. Incidental detection of filaria in fine-needle aspirates: A cytologic study of 14 clinically unsuspected cases at different sites. *Diagn Cytopathol* 2010.

Monge-Maillo B, Norman F, Perez-Molina JA, Diaz-Menendez M, Rubio JM, Lopez-Velez R. *Plasmodium falciparum* in asymptomatic immigrants from sub-Saharan Africa, Spain. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(2):356-357.

Monge-Maillo B, Lopez-Velez R, Norman FF, Ferrere-Gonzalez F, Martinez-Perez A, Perez-Molina JA. Screening of imported infectious diseases among asymptomatic sub-Saharan African and Latin American immigrants: a public health challenge. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92(4):848-856.

Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1):66-78.

Moraes MA, Shelley AJ, Dias AP, Silva CJ. The concentration of *Mansonella ozzardi* microfilariae in skin capillaries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77(4):463-466.

Morales-Hojas R, Post RJ, Shelley AJ, Maia-Herzog M, Coscaron S, Cheke RA. Characterisation of nuclear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of a PCR-based method for their detection in skin biopsies. *Int J Parasitol* 2001; 31(2):169-177.

More SJ, Copeman DB. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 1990; 41(4):403-406.

Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* 2007; 23(6):278-283.

Muller M, Schlagenhauf P. *Plasmodium knowlesi* in travellers, update 2013. *Int J Infect Dis* 2014.

Munoz J, Rojo-Marcos G, Ramirez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Trevino B, Perez Arellano JL et al. [Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015; 33(6):e1-e13.

Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria diagnostics in clinical trials. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89(5):824-839.

"  
"

Murray CK, Bennett JW. [Not Available]. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009; 2009:415953.

Nanduri J, Kazura JW. Clinical and laboratory aspects of filariasis. Clin Microbiol Rev 1989; 2(1):39-50.

Nankabirwa J, Zurovac D, Njogu JN, Rwakimari JB, Counihan H, Snow RW et al. Malaria misdiagnosis in Uganda--implications for policy change. Malar J 2009; 8:66.

Nathan MB, Bartholomew CF, Tikasingh ES. The detection of *Mansonella ozzardi* microfilariae in the skin and blood with a note on the absence of periodicity. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72(4):420-422.

Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. J Clin Microbiol 2004; 42(6):2694-2700.

Nishimoto Y, Arisue N, Kawai S, Escalante AA, Horii T, Tanabe K et al. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. Mol Phylogenet Evol 2008; 47(1):45-53.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12):E63.

Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg 2005; 73(5):895-900.

Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria J 2007; 6:6.  
Ohrt C, O'Meara WP, Remich S, McEvoy P, Ogutu B, Mtalib R et al. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. Malar J 2008; 7:22.

Oliveira TY, Harris EE, Meyer D, Jue CK, Silva WA, Jr. Molecular evolution of a malaria resistance gene (DARC) in primates. Immunogenetics 2012.

OMS, 2013. Enfermedades tropicales desatendidas. Prevención, control, eliminación y erradicación. Pp: A66.20 1-8. 66.<sup>a</sup> ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD. Ginebra. Suiza.

Pain A, Bohme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP et al. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. Nature 2008; 455(7214):799-803.

Palumbo E. Filariasis: diagnosis, treatment and prevention  
233. Acta Biomed 2008; 79(2):106-109.

Perandin F, Manca N, Piccolo G, Calderaro A, Galati L, Ricci L et al. Identification of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy. New Microbiol 2003; 26(1):91-100.

Perez-Molina JA, Diaz-Menendez M, Perez-Ayala A, Ferrere F, Monje B, Norman F et al. [Treatment of diseases caused by parasites]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28(1):44-59.

Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. Malar J 2009; 8:89.

Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. Parasitol Res 2009; 104(6):1527-1533.



"  
"

Polley SD, Gonzalez IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis* 2013; 208(4):637-644.

Post RJ, Adams Z, Shelley AJ, Maia-Herzog M, Luna Dias AP, Coscaron S. The morphological discrimination of microfilariae of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. *Parasitology* 2003; 127(Pt 1):21-27.

Quispe AM, Pozo E, Guerrero E, Durand S, Baldeviano GC, Edgel KA et al. *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria region: severe vivax malaria? *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(1):11-17.

Ramirez-Olivencia G, Rubio JM, Rivas P, Subirats M, Herrero MD, Lago M et al. Imported submicroscopic malaria in Madrid. *Malar J* 2012; 11:324.

Ramzy RM. Recent advances in molecular diagnostic techniques for human lymphatic filariasis and their use in epidemiological research. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1:S225-S229.

Reller ME, Clemens EG, Schachterle SE, Mtove GA, Sullivan DJ, Dumler JS. Multiplex 5' nuclease-quantitative PCR for diagnosis of relapsing fever in a large Tanzanian cohort. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9):3245-3249.

Remme J, Baker RH, De Sole G, Dadzie KY, Walsh JF, Adams MA et al. A community trial of ivermectin in the onchocerciasis focus of Asubende, Ghana. I. Effect on the microfilarial reservoir and the transmission of *Onchocerca volvulus*. *Trop Med Parasitol* 1989; 40(3):367-374.

Rojo-Marcos G, Cuadros-Gonzalez J, Mesa-Latorre JM, Culebras-Lopez AM, Pablo-Sanchez R. Acute respiratory distress syndrome in a case of *Plasmodium ovale* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(3):391-393.

Rojo-Marcos G, Rubio-Munoz JM, Ramirez-Olivencia G, Garcia-Bujalance S, Elcuaz-Romano R, Diaz-Menendez M et al. Comparison of imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among patients in Spain, 2005-2011. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(3):409-416.

Rooney AP. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans. *Mol Biol Evol* 2004; 21(9):1704-1711.

Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009; 49(7):1103-1108.

Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M et al. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10):3260-3264.

Rubio JM, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S, Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2736-2737.

Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1:S199-S204.

Runsewe-Abiodun IT, Efunshile M, Ghebremedhin B, Sotimehin AS, Ajewole J, Akinleye J et al. Malaria diagnostics: a comparative study of blood microscopy, a rapid diagnostic test and polymerase chain reaction in the diagnosis of malaria. *J Trop Pediatr* 2012; 58(2):163-164.

"  
"

Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. *Plasmodium knowlesi*: from Malaysia, a novel health care threat. *Infez Med* 2012; 20(1):5-11.

Sakthidevi M, Murugan V, Hoti SL, Kaliraj P. Lymphatic filarial species differentiation using evolutionarily modified tandem repeats: generation of new genetic markers. *Infect Genet Evol* 2010; 10(4):591-594.

Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D, Eling W et al. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 137(1):35-41.

Scott AL, Ghedin E. The genome of *Brugia malayi* - all worms are not created equal. *Parasitol Int* 2009; 58(1):6-11.

Shelley AJ, Coscaron S. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(4):451-458.

Shelley AJ, Maia-Herzog M, Calvao-Brito R. The specificity of an ELISA for detection of *Onchocerca volvulus* in Brazil in an area endemic for *Mansonella ozzardi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(2):171-173.

Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop* 2011; 120 Suppl 1:S109-S120.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(4):687-692.

Singh B, Kim SL, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004; 363(9414):1017-1024.

Singh B, Daneshvar C. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Med J Malaysia* 2010; 65(3):166-172.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do R, V et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61(2):315-320.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58(2):283-292.

Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol* 1996; 50:263-291.

Soler CP, Gerome P, Soullie B, Tisedre F, Bejan H, Yvetot J et al. [Comparison of techniques used to screen blood donations for malaria antibodies]. *Med Trop (Mars)* 2003; 63(6):587-589.

Strom GE, Tellevik MG, Hanevik K, Langeland N, Blomberg B. Comparison of four methods for extracting DNA from dried blood on filter paper for PCR targeting the mitochondrial *Plasmodium* genome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014; 108(8):488-494.

Strom GE, Moyo S, Fataki M, Langeland N, Blomberg B. PCR targeting *Plasmodium* mitochondrial genome of DNA extracted from dried blood on filter paper compared to whole blood. *Malar J* 2014; 13:137.

Subbarao SK. Centenary celebrations article: *Plasmodium knowlesi*: from macaque monkeys to humans in South-east Asia and the risk of its spread in India. *J Parasit Dis* 2011; 35(2):87-93.

"  
"

Sulistyaningsih E, Fitri LE, Loscher T, Berens-Riha N. Diagnostic difficulties with *Plasmodium knowlesi* infection in humans. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(6):1033-1034.

Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J* 2014; 13(1):68.

Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Martinez MC, Lanza M, Arroyo E et al. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar J* 2010; 9:219.

Tajebe A, Magoma G, Aemero M, Kimani F. Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real-time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malar J* 2014; 13:411.

Tan LH, Fong MY, Mahmud R, Muslim A, Lau YL, Kamarulzaman A. Zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in a suburbia of Kuala Lumpur City, Malaysia. *Parasitol Int* 2011; 60(1):111-113.

Tang TH, Lopez-Velez R, Lanza M, Shelley AJ, Rubio JM, Luz SL. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(6):823-828.

Tanner NA, Evans TC, Jr. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* 2014; 105:Unit.

Taylor MJ. A new insight into the pathogenesis of filarial disease. *Curr Mol Med* 2002; 2(3):299-302.

Taylor SM, Mayor A, Mombo-Ngoma G, Kenguele HM, Ouedraogo S, Ndam NT et al. A quality control program within a clinical trial Consortium for PCR protocols to detect *Plasmodium* species. *J Clin Microbiol* 2014; 52(6):2144-2149.

Teerthanath S, Hariprasad S. A case of *Dirofilaria immitis* presenting as an intramuscular soft tissue mass. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54(2):428-430.

Teixeira SM, Vieira LQ, Gazzinelli RT. Genomics, pathogenesis and control of infection with protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2002; 18(2):52-54.

Thambiah G, Whitworth J, Hommel M, Devaney E. Identification and characterization of a parasite antigen in the circulating immune complexes of *Onchocerca volvulus* infected patients. *Trop Med Parasitol* 1992; 43(4):271-276.

Thanomsub BW, Chansiri K, Sarataphan N, Phantana S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. *Mol Cell Probes* 2000; 14(1):41-46.

Thuy-Huong Ta Tang, Marwa Ali-Tammam, Marta Lanza, José M. Rubio  
"Detección e identificación de plasmodios mediante PCR múltiple semianidada"  
Capítulo 30: "Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos"  
1ª ed. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología, 2011.  
ISBN 978-987-26716-0-0

Tiburcio M, Sauerwein R, Lavazec C, Alano P. Erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. *Trends Parasitol* 2015; 31(6):270-278.

Toe L, Boatín BA, Adjami A, Back C, Merriweather A, Unnasch TR. Detection of *Onchocerca volvulus* infection by O-150 polymerase chain reaction analysis of skin scratches. *J Infect Dis* 1998; 178(1):282-285.

Torrus D, Carranza C, Manuel RJ, Carlos RJ, Rubio JM, Subirats M et al. [Microbiological diagnosis of imported malaria]

"  
"

476. Enferm Infecc Microbiol Clin 2015; 33 Suppl 2:40-46.

Toure FS, Kassambara L, Williams T, Millet P, Bain O, Georges AJ et al. Human occult loiasis: improvement in diagnostic sensitivity by the use of a nested polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(1):144-149.

Toure FS, Leroy EM, Mavoungou E, Egwang TG. Sequence conservation of repeat 3 region of the gene coding for the 15 kDa polyprotein within human and simian *Loa loa*. J Med Primatol 1999; 28(2):57-61.

Traore S, Wilson MD, Sima A, Barro T, Diallo A, Ake A et al. The elimination of the onchocerciasis vector from the island of Bioko as a result of larviciding by the WHO African Programme for Onchocerciasis Control. Acta Trop 2009; 111(3):211-218.

Vadivelan M, Dutta T. Recent advances in the management of *Plasmodium knowlesi* infection. Trop Parasitol 2014; 4(1):31-34.

Vallejo AF, Martinez NL, Gonzalez IJ, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Evaluation of the loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP) kit for malaria diagnosis in *P. vivax* endemic settings of Colombia. PLoS Negl Trop Dis 2015; 9(1):e3453.

van den EP, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, Hung I, X et al. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. Malar J 2009; 8:249.

van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. Mol Biochem Parasitol 1992; 51(1):133-142.

Van Hong N, van den EP, Van Overmeir C, Vythilingam I, Rosanas-Urgell A, Vinh TP et al. A modified semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR) for the identification of the five human *Plasmodium* species occurring in Southeast Asia. Am J Trop Med Hyg 2013; 89(4):721-723.

Vincent JA, Lustigman S, Zhang S, Weil GJ. A comparison of newer tests for the diagnosis of onchocerciasis. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94(3):253-258.

Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemia and the ecology of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg 2002; 66(6):639-640.

Walker M, Specht S, Churcher TS, Hoerauf A, Taylor MJ, Basanez MG. Therapeutic Efficacy and Macrophilicidal Activity of Doxycycline for the Treatment of River Blindness. Clin Infect Dis 2014.

Walther M, Muller R. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). Adv Parasitol 2003; 53:149-193.

Wang B, Han SS, Cho C, Han JH, Cheng Y, Lee SK et al. Comparison of Microscopy, Nested and Real-Time PCR-Based Assays with High-Throughput Pooled Samples for Screening Asymptomatic Malaria Carriers from Endemic Areas of Myanmar. J Clin Microbiol 2014.

Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(8):3140-3144.

Weil GJ. Re: S.P. Pani et al. Evaluation of the ICT whole blood antigen card test to detect infection due to nocturnally periodic *Wucheria bancrofti* in South India. Tropical Medicine and International Health 5, 359-363. Trop Med Int Health 2000; 5(11):832-833.

Weil GJ, Steel C, Liftis F, Li BW, Mearns G, Lobos E et al. A rapid-format antibody card test for diagnosis of onchocerciasis. J Infect Dis 2000; 182(6):1796-1799.

- WHO. Status report on artemisinin and ACT resistance september 2015. Global malaria programme. Geneva. Suiza.
- Farrar J, Hotez P, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White N.J, (2014) Manson's Tropical diseases 23rd. Oxford, UK. Elsevier.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. World Health Organ Tech Rep Ser 2014;(980):1-489, back.
- White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. Malar J 2011; 10:297.
- William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S et al. Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. Emerg Infect Dis 2011; 17(7):1248-1255.
- William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S et al. Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia 228. Emerg Infect Dis 2011; 17(7):1248-1255.
- Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. Clin Infect Dis 2012; 54(11):1637-1641.
- Wirth DF. Biological revelations. Nature 2002; 419(6906):495-496.
- Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU et al. High proportion of *knowlesi* malaria in recent malaria cases in Malaysia. Malar J 2014; 13:168.
- Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizotte-Waniewski M, Chanteau S, Nutman TB et al. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. Am J Trop Med Hyg 1996; 54(4):357-363.
- Zimmerman PA, Guderian RH, Aruajo E, Elson L, Phadke P, Kubofcik J et al. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. J Infect Dis 1994; 169(3):686-689.